



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**Estructura sináptica de los circuitos tálamo-  
corticales: análisis cuantitativo 3D de los botones  
sinápticos de los núcleos ventral posteromedial y  
posterior del ratón adulto**

TESIS DOCTORAL

Javier Rodríguez Moreno

Dirigida por el Doctor

Francisco Clascá Cabré

Madrid, 2017



**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia**

Francisco Clascá Cabré, Catedrático de Anatomía Humana y Neurociencia del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

**HACE CONSTAR:**

Que Javier Rodríguez Moreno ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral “Estructura sináptica de los circuitos tálamo-corticales: análisis cuantitativo 3D de los botones sinápticos de los núcleos ventral posteromedial y posterior del ratón adulto”, que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 22 de mayo de 2017.

Fdo.: Francisco Clascá Cabré

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto Human Brain Project – EU Flagship.  
Subproject 1 : Strategic Mouse Data, de la Unión Europea.

## RESUMEN

Las proyecciones tálamo-corticales constituyen la vía de entrada a la corteza cerebral de información sensorial procedente de la periferia. Además, constituyen un relevo de información entre áreas corticales estableciendo un control del flujo de información en la comunicación cortico-tálamo-cortical. Lejos de ser similares, las neuronas talámicas, agrupadas en diferentes núcleos, poseen una diversidad en cuanto a sus arquitecturas axónicas conectivas, lo que, en último término, determina su función.

En la corteza somatosensorial primaria de roedores, las sinapsis ‘lemniscas’ o ‘específicas’ procedentes de la porción dorsomedial del núcleo ventral posteromedial talámico (VPMdm) se establecen con las neuronas de capa 4, mientras que el núcleo posterior (Po), ‘paralemniscal’ o ‘multiespecífico’, conecta con las neuronas piramidales de capa 5a. A pesar del reducido número de botones tálamo-corticales, su sinapsis es altamente eficaz, lo cual podría depender de las características estructurales que presentan dichos botones. A través de un abordaje de microscopía electrónica, se han reconstruido y analizado cuantitativamente axones anterógradamente marcados, de ambos núcleos talámicos, en sus correspondientes capas corticales.

La mayoría de las sinapsis se han localizado en botones, los cuales han mostrado diferencias en cuanto a su tamaño, número y tamaño mitocondrial y número de vesículas sinápticas. Además, los botones han establecido contacto sináptico en un 80% con espinas dendríticas, algunas de las cuales forman grandes protrusiones dendríticas incluidas por la membrana del botón presináptico. Se ha observado una densidad postsináptica de tamaño similar en ambas poblaciones, sin embargo, existe una mayor porcentaje de botones multisinápticos en axones procedentes de VPMdm.

En conjunto, las características estructurales de los elementos pre- y postsináptico contribuyen al diferente fenotipo funcional observado para los axones de VPMdm como núcleo talámico de ‘primer orden’, y para los axones de Po como núcleo talámico de ‘orden superior’ implicado en la modulación de la transmisión sináptica.

**Palabras clave:** Tálamo, Corteza somatosensorial, Diversidad sináptica, Microscopía electrónica de transmisión, Espinas dendríticas.



## SUMMARY

Thalamocortical projections are the main input relying sensory information from the periphery to the cortex. In addition, they are part of a corticothalamocortical loop between areas with a modulatory control. Far from being similar, thalamic neurons in different thalamic nuclei have different axonal architectures, which determine its function.

In rodents, synapses from the “specific” or “lemniscal” dorsomedial portion of the ventral posteromedial nucleus (VPMdm) drive the primary somatosensory cortex layer 4 neurons, while the 'paralemniscal' or 'multispecific' posterior nucleus (Po), connects with layer 5a pyramidal neurons. Despite the relative low number of thalamocortical boutons, their synapses are highly effective, which may depend on the structural synaptic features of these boutons. Through an electron microscopy approach, we 3D-reconstructed and quantitatively analyzed anterogradely labeled axons from both thalamic nuclei in their corresponding cortical layers.

Virtually all synapses are located in boutons, which have shown differences in their size, number and mitochondrial size and number of synaptic vesicles. In addition, 80% of synapses are on dendritic spines, some of which form large dendritic protrusions included by the presynaptic bouton membrane. Both populations has been showed a postsynaptic density of similar size, however, there is a higher percentage of multisynaptic boutons in VPMdm axons.

Taken together, the structural features of different pre- and postsynaptic elements contribute to the different functional phenotype observed for VPMdm axons as a 'first order' thalamic nucleus, and for Po axons as a 'higher order' thalamic nucleus involved in the modulation of synaptic transmission.

**Keywords:** Thalamus, Somatosensory cortex, Synaptic diversity, Transmission electron microscopy, Dendritic spines.

# Índice

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>II</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EL TÁLAMO Y LOS AXONES TÁLAMO-CORTICALES.....</b>	<b>3</b>
<b>2. RELEVANCIA DEL ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-</b>	
<b>CORTICALES.....</b>	<b>5</b>
<b>3. LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL .....</b>	<b>10</b>
3.1. La Sinapsis Tálamo-Cortical como Modelo de Eficacia Sináptica.....	11
3.2. El Estudio de la Microestructura de la Sinapsis Tálamo-Cortical. El Botón	
Sináptico.....	14
3.3. Los Elementos del Botón Sináptico: Densidad Presináptica, Mitocondria y	
Vesículas Sinápticas.....	20
3.4. El Elemento Postsináptico: La Densidad Postsináptica.....	23
3.5. El Elemento Postsináptico: Espinas Dendríticas vs. Tallos Dendríticos .....	25
<b>4. LA CORTEZA DE BARRILES DEL RATÓN COMO MODELO DE ESTUDIO</b>	
<b>DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL .....</b>	<b>29</b>
4.1. Las Diversas Vías Trigémico-Tálamo-Corticales.....	31
4.2. Los Axones Procedentes del VPMdm y Po como Elementos Presinápticos de la	
STC en la S1BF.....	33
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN</b>	
<b>48</b>	
<b>3. TÉCNICA DE TRAZADO POBLACIONAL ANTERÓGRADO.....</b>	<b>49</b>
<b>4. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.....</b>	<b>51</b>
4.1. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica .....	52
4.2. Técnica de corte seriado ultrafino y contratinción de secciones ultrafinas para su	
visualización en TEM .....	53
4.3. Preparación adicional de muestras para su visualización en FIB/SEM .....	55
<b>5. IDENTIFICACIÓN DE PERFILES.....</b>	<b>55</b>

<b>6. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE PERFILES .....</b>	<b>57</b>
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>60</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>1. VISUALIZACIÓN A MICROSCOPIA ÓPTICA DE LOS AXONES MARCADOS CON BDA.....</b>	<b>63</b>
1.1. Experimentos de trazado anterógrado con depósitos de BDA en VPMdm .....	63
1.2. Experimentos de trazado anterógrado con depósitos de BDA en Po.....	66
<b>2. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS BOTONES SINÁPTICOS TÁLAMO-CORTICALES MARCADOS EN S1BF .....</b>	<b>69</b>
2.1. Caracterización morfológica de los botones sinápticos del núcleo VPMdm talámico en la capa 4 de S1BF .....	69
2.2. Caracterización morfológica de los botones sinápticos del núcleo Po talámico en la capa 5a de S1BF .....	73
<b>3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA DENSIDAD POSTSINÁPTICA....</b>	<b>77</b>
3.1. Caracterización morfológica de la PSD correspondiente a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo VPMdm.....	77
3.2. Caracterización morfológica de la PSD correspondiente a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo Po .....	79
<b>4. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL PERFIL POSTSINÁPTICO: ESPINAS VS. SEGMENTOS DENDRÍTICOS.....</b>	<b>81</b>
4.1. Caracterización morfológica de los perfiles postsinápticos correspondientes a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo VPMdm.....	81
4.2. Caracterización morfológica de los perfiles postsinápticos correspondientes a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo Po .....	83
<b>5. ANÁLISIS CON FIB/SEM DE LOS AXONES PROCEDENTES DEL VPMdm Y SUS ELEMENTOS POSTSINÁPTICOS.....</b>	<b>85</b>
<b>6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL .....</b>	<b>90</b>
6.1. Análisis cuantitativo de parámetros estructurales correspondientes a la sinapsis de los botones marcados de VPMdm.....	90
6.2. Análisis cuantitativo de parámetros estructurales correspondientes a la sinapsis de los botones marcados de Po .....	94
<b>7. ANÁLISIS COMPARATIVO DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL. VPMdm VS. Po .....</b>	<b>99</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>104</b>

<b>1. RELEVANCIA Y LIMITACIONES TÉCNICAS DEL ANÁLISIS DE BOTONES SINÁPTICOS TÁLAMO-CORTICALES IDENTIFICADOS.....</b>	<b>108</b>
<b>2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CON ESTUDIOS PREVIOS SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS ELEMENTOS DE LA SINAPSIS.....</b>	<b>113</b>
2.1. Tamaño del Botón y Número de Sinapsis.....	114
2.2. Vesículas sinápticas .....	117
2.3. El papel de la mitocondria .....	118
2.4. Tamaño y morfología de la PSD.....	119
2.5. Elementos postsinápticos a los axones de VPMdm y Po: espinas vs. segmentos dendríticos .....	121
2.6. Protrusiones de las espinas dendríticas .....	123
<b>3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS DE LOS NÚCLEOS VPMdm Y Po.....</b>	<b>124</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>

# I. INTRODUCCIÓN

---



### 1. EL TÁLAMO Y LOS AXONES TÁLAMO-CORTICALES.

El tálamo es una estructura diencefálica par, situada a ambos lados de la línea media y originada, casi en su totalidad, a partir del neuroepitelio de la región alar del segundo prosómero del cerebro embrionario (Puelles y Rubenstein, 2003). El tálamo está compuesto por neuronas de proyección (NTPs) a distintas regiones, tanto corticales como subcorticales, y un número variable de interneuronas gabaérgicas; estas últimas son muy escasas en roedores e insectívoros, y muy numerosas (hasta un 30% del total) en primates (Sherman y Guillery, 2006). Las células talámicas se agrupan en “núcleos” diferenciables por el distinto tamaño de sus somas neuronales, y distinguibles a través de distintas tinciones inmunohistoquímicas. En base a estos criterios morfológicos se ha parcelado el tálamo de diversas especies proveyendo una organización celular en núcleos diferenciados que están implicados en diferentes funciones, y que, además, están asociados a una distribución específica de las aferencias que cada uno recibe (Jones, 2007).

Todas las NTPs presentan unas características similares en cuanto a su morfología dendrítica y expresión de diversos marcadores moleculares y canales iónicos; siendo todas de neurotransmisión glutamatérgica, todo ello derivado de su origen embrionario común (Murray y cols., 2007). Su conformación dendrítica multipolar espinosa y su alta expresión de canales tipo T de calcio les confiere la capacidad de responder a determinada estimulación de forma variable dependiendo del nivel de excitación/inhibición que reciben (Jones, 2007).

Las capacidades sensitivo-motoras y cognitivas características de los mamíferos, así como su ajuste dinámico en los diversos estados conductuales emergen de la interacción recíproca entre el tálamo y la corteza cerebral. El sustrato celular que hace posible tal interacción son dos masivos sistemas axónicos: los axones tálamo-corticales (TCAs) en sentido ascendente, y los axones córtico-talámicos, descendentes (Sherman y Guillery, 2006; Llinás y Steriade, 2006). Los TCAs constituyen el principal sistema aferente que la corteza cerebral recibe del resto del sistema nervioso. Estos axones brotan de las NTPs, localizadas en los distintos núcleos del tálamo. Desde cada núcleo, los TCAs atraviesan la lámina medular externa y el núcleo reticular del tálamo y ascienden hacia la corteza a

través de la cápsula interna para alcanzar todas las áreas del neocortex, así como algunas de la formación hipocampal y la amígdala. En su camino ascendente dejan ramas colaterales en el núcleo reticular, y muchos también lo hacen en el estriado (Deschênes y cols., 1998; Mólnar y cols., 1998). Los TCAs son estrictamente ipsilaterales y cada axón arboriza selectivamente en áreas y capas determinadas de la corteza cerebral.

Junto a la actividad intrínsecamente generada en las propias neuronas talámicas, y en sus interacciones con el núcleo reticular y las interneuronas talámicas, la información que estas células envían a la corteza resulta de la integración de impulsos procedentes de diversos sistemas de axones que alcanzan cada zona del tálamo. Las aferencias más numerosas son las que proceden de la corteza cerebral. Además, diversos grupos neuronales prosencefálicos (incluida la retina), troncoencefálicos, o espinales, inervan selectivamente las distintas regiones del tálamo. En el conjunto de los circuitos neuronales del cerebro, los TCAs constituyen, por una parte, la vía de entrada a la corteza cerebral para todas las modalidades de información sensorial extero- e interoceptiva de origen contralateral, con la excepción del olfato; y por otra, son la vía de re-entrada a la corteza de los grandes “bucles” multisinápticos que ésta mantiene con estructuras subcorticales como los ganglios basales y el cerebelo. Por último, los TCAs forman parte de un masivo sistema de comunicación córtico-tálamo-cortical que parece incrementar su tamaño e importancia funcional de un modo paralelo a la diversificación y expansión de la corteza cerebral en mamíferos superiores (Theyel y cols., 2010)

Dado que la principal diana sináptica de las NTPs es la corteza cerebral, salvo excepciones, se las denomina generalmente como neuronas de proyección tálamo-cortical (NTCs). Aunque desde el punto de vista electrofisiológico poseen básicamente las mismas propiedades intrínsecas de membrana, existen varios tipos con arquitectura axónica diversa, lo cual posibilita la multiplicidad de funciones en las que el tálamo participa (Sherman y Guillery, 2006).

Debido a su relevancia funcional, las proyecciones tálamo-corticales (TCs) han sido un objeto de estudio relevante durante muchos años. Pero a día de hoy, el conocimiento estructural preciso se basa en una descripción poco profunda de la diversidad presente en sus arquitecturas axónicas, así como en una muy poco detallada microestructura a nivel



de su sinapsis en corteza, ambas fundamentales para la comprensión y la realización de modelos que abarquen todos sus aspectos funcionales.

### 2. RELEVANCIA DEL ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES

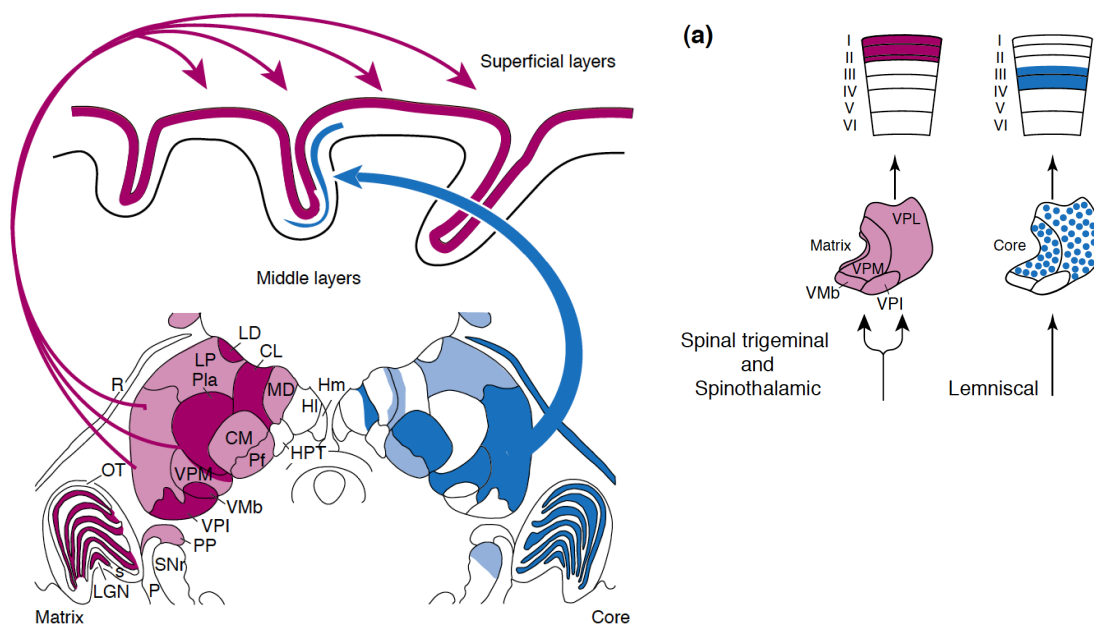
Durante décadas se pensó que el tálamo era una estructura diencefálica cuya función principal era la de filtrar la información sensorial y transmitirla a través de sus proyecciones desde núcleos concretos, alcanzando así de manera topográfica, áreas específicas de la corteza cerebral; por lo que el tálamo sería una estación de relevo para la información sensorial en su camino hacia la corteza cerebral (Mumford, 1995). Gracias a la segregación de las proyecciones TCs y su especificidad sensorial aparente en la transmisión de información, han sido un modelo idóneo para el estudio de la relación tálamo-corteza cerebral. Sin embargo, posteriormente se observó otro tipo de proyecciones talámicas que se dirigían a varias áreas corticales sin mostrar ese patrón focal descrito clásicamente. Gracias a las técnicas de trazado poblacional de neuronas y su más potente desarrollo en técnicas de trazado de neuronas individuales por vectores virales, se ha demostrado una amplia diversidad de arquitecturas axónicas procedentes de los distintos núcleos talámicos.

Desde los estudios de Lorente de Nó (1922) hasta nuestros días, se han ido describiendo y matizando los dos tipos de TCAs: por un lado los “específicos” que arborizan focalmente en un área cortical específica, concretamente en la capa 4; y por otro lado los “inespecíficos” que inervan varias regiones de la corteza cerebral y suelen arborizar en varias capas incluyendo la capa 1. Antes de la aparición de las técnicas de trazado, estudios basados en técnicas de degeneración retrógrada fueron fundamentales para esclarecer proyecciones específicas, ya que se lesionaba una región cortical específica y se observaba degeneración neuronal en el núcleo talámico que la inervaba (Le Gros Clark, 1932; Waller, 1934; Walker, 1937; Rose y Woolsey, 1949).

Sin embargo, con la introducción en los años 70 de las técnicas de trazado axonal, esta clasificación fue ampliada gracias al descubrimiento de diversos fenotipos de NTCs que

atendían a su patrón de arborización tangencial en la corteza cerebral, así como a su patrón de arborización laminar y a su innervación adicional de estructuras subcorticales como el estriado. Los primeros estudios de trazado axonal utilizando aminoácidos tritiados desarrollados por Herkenham (1978, 1979, 1980, 1986) definieron tres tipos de proyecciones talámicas: las “específicas”, como las del núcleo ventral posterior (VP), que arborizaban focalmente en una región cortical en las capas 4 y 3b y en la capa 6; las procedentes de núcleos “intralaminares”, que innervaban regiones corticales extensas arborizando en las capas profundas; y las procedentes de núcleos “paralaminares” o “1+”, como las del núcleo posterior (Po), que innervaban varias regiones corticales cambiando su patrón laminar e innervaban la capa 1 cortical. La aplicación de trazadores retrógrados en la corteza cerebral fue ampliando y matizando dicha clasificación atendiendo a la morfología y distribución de los somas de las NTCs en los diferentes núcleos talámicos (Macchi, 1983, Rausell y Jones, 1995). Se observó que los somas de las neuronas que innervaban la capa 1 eran de menor tamaño y además se localizaban en subnúcleos o aparecían entremezcladas, por lo que se las llamó el “sistema proyectante a capa 1” o “LIPS” (Rausell y Avendaño, 1985; Avendaño y cols., 1990).

No fue hasta finales de los años 90 donde se volvió a un sistema clásico de clasificación dicotómica de las NTCs propuesto por Edward Jones gracias a sus estudios con macacos, correlacionando patrones de proyección con la expresión en las NTCs de proteínas ligadoras de calcio (revisado en Jones 1998a, 1998b, 2001, 2002). Según Jones existirían por tanto, las neuronas de tipo “core” talámicas que expresarían parvalbúmina (PV) y que innervaban capas intermedias de regiones corticales específicas; y las neuronas de tipo “matriz” distribuidas por todo el tálamo y que expresarían calbindina e innervaban la capa 1 de amplias regiones corticales (Figura 1).



**FIGURA 1: Distribución de las neuronas de tipo matriz (rosa) y de tipo core (azul) en el tálamo de primates y sus patrones de invasión laminar cortical.** Tomado de Jones (2001)

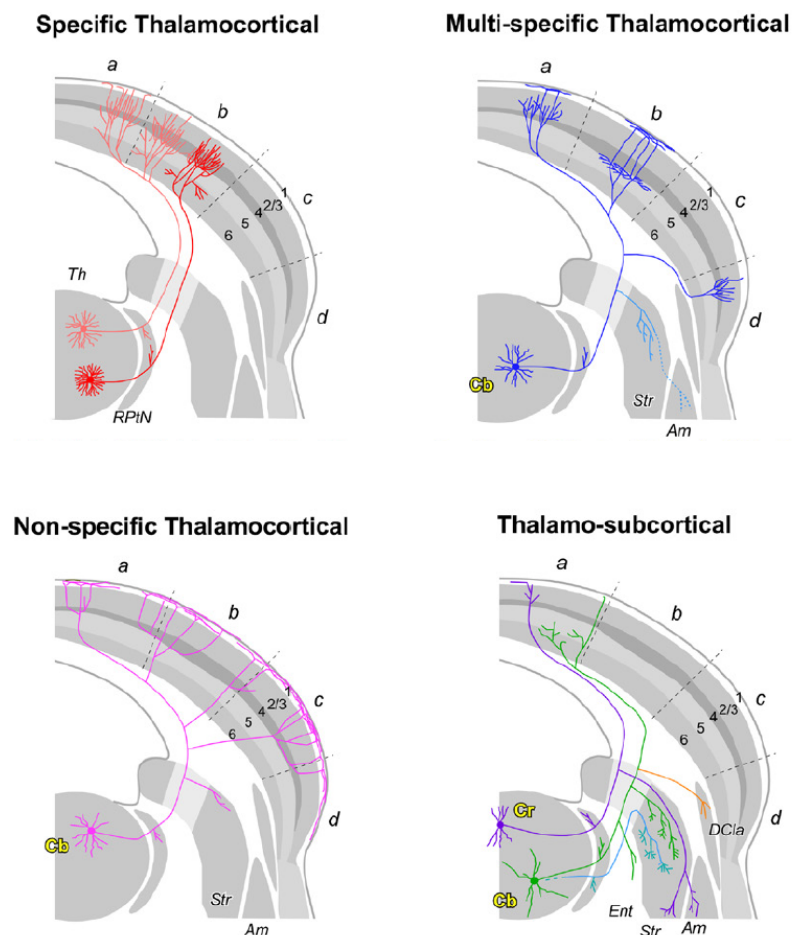
Por tanto, las neuronas tipo “matriz” inervarían múltiples áreas corticales distantes o por el contrario arborizarían en pocas áreas corticales adyacentes, produciendo un patrón de invasión tanto divergente como convergente. Estas interacciones serían el fundamento de la sincronización dinámica de amplios grupos neuronales dispersos (Jones, 2007; Rubio-Garrido y cols., 2009).

El desarrollo de nuevos trazadores axonales anterógrados, como la leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) o los dextranos, y, en los últimos años, los vectores virales adenoasociados codificantes para proteínas fluorescentes (Chamberlin y cols., 1998), ha permitido el estudio anatómico detallado de diversas vías, no sólo TCs, sino entre otras regiones cerebrales, dando lugar a un amplio concepto de estudio, ahora en auge, llamado conectómica, la cual busca trazar mapas de conexiones neuronales, es decir, describir redes de conexiones sinápticas que subyacen a la organización estructural y funcional del cerebro. Esta disciplina se basa en que las neuronas integran los ‘inputs’ que reciben y producen ‘outputs’ para otras neuronas, es decir, las neuronas computan una suma de las aferencias que reciben produciendo posteriormente una respuesta adecuada; además, los cambios en la potenciación de la actividad sináptica derivan de señales locales, las cuales son comparadas con el estado global subyacente (Adams y Cox, 2002).

Sin embargo, estos trazadores altamente sensibles, tienen sus limitaciones, es decir, es posible que existan poblaciones heterogéneas de neuronas con diferentes patrones de proyección dentro de una misma región, por ejemplo, dentro de un núcleo talámico, por lo que la aplicación de estos trazadores para el marcado poblacional podría estar enmascarando diferentes patrones unívocos de proyección. Por tanto, para conseguir el trazado de neuronas individuales se desarrolló la técnica de inyección yuxtacelular (Pinault, 1996), que consiste en iontoforetizar el trazador en la proximidad de la neurona utilizando corrientes de muy baja intensidad. Con esta técnica se han logrado trazar neuronas de proyección individuales en diferentes regiones como en la sustancia negra (Prensa y Parent, 2001; Cebrian y cols., 2005), además se ha podido comprobar la existencia de NTCs multirramificadas, por ejemplo, en el Po (Veinante y Deschênes, 2003; Noseda y cols., 2010; 2011). Sin embargo, debido al fundamento de esta técnica de marcado individual a baja intensidad, es muy posible que el axón no sea revelado completamente, sobre todo en axones muy largos y complejos (Veinante y Deschênes, 2003). Esta dificultad ha sido solventada gracias al diseño de un vector viral incompetente para la replicación y basado en el alfavirus ARN SINDBIS que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) (Furuta y cols., 2001). Por tanto, realizando inyecciones de este vector viral se ha conseguido trazar completamente axones complejos y muy extensos, como los correspondientes al núcleo Po (Ohno y cols., 2012), así como desde otros núcleos talámicos (Kuramoto y cols., 2009; 2015; Nakamura y cols., 2015). Además, en nuestro laboratorio, se ha mejorado dicha técnica, gracias a que se ha podido aislar el ARN del virus y se ha conseguido electroporar dentro de las neuronas, aumentando así la precisión de la técnica (Porrero, Rodríguez-Moreno, y cols., 2016).

A consecuencia de los últimos estudios con trazadores de gran sensibilidad, nuestro grupo ha propuesto una nueva clasificación de las NTCs, basada en los diferentes fenotipos axonales que presentan (Figura 2) (Clascá y cols., 2016). Así, se distinguirían cuatro grupos: 1) las NTCs específicas, que inervan una o dos áreas adyacentes de manera focal en la capa 4 y 3b, y de forma menos densa en la capa 6. Este fenotipo se encuentra en los núcleos primarios de relevo sensitivos y motores como el VP. Por tanto, transmiten la información subcortical de forma muy precisa y topográfica (Bruno y Sackmann, 2006; Petreanu y cols., 2009). 2) las neuronas talamo-subcorticales, que inervan el estriado y otras estructuras subcorticales como la amígdala, muestran una inervación cortical poco densa y en capas infragranulares. Este fenotipo es propio de los núcleos intralaminares,

los cuales ejercerían una modulación sobre el circuito de los ganglios basales. 3) las NTCs inespecíficas, que inervan amplias regiones de la corteza cerebral arborizando en la capa 1 superficial donde establecerían sinapsis con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas 2-3 y 5. Este fenotipo se encuentra en núcleos como el ventromedial (VM), e intervienen en la modulación del circuito cortico-cortical (CC) y cortico-subcortical. 4) las NTCs multispecíficas, que inervan varias áreas corticales de manera focal. Además, el patrón laminar de arborización de una misma neurona puede variar en las distintas áreas corticales. Este fenotipo tan especial se encuentra en ciertos núcleos talámicos como el Po (Ohno y cols., 2012), los cuales estarían encargados de regular flujos de información espacialmente segregados, además de integrar dicha información de forma distinta en las diferentes áreas corticales.



**FIGURA 2: Clasificación de las NTCs basada en los diferentes fenotipos de distribución axonal que presentan.** Modificado de Clascá y cols. (2016)

Toda esta diversidad encontrada dentro de las NTCs, pone de manifiesto una segunda cuestión que necesita ser explorada, es decir, las diferencias expuestas en el patrón de innervación de estos axones gracias al estudio detallado con trazadores anterógrados de pequeñas poblaciones neuronales dentro de los distintos núcleos talámicos, así como, el estudio a nivel de neuronas individuales, implican que los distintos subtipos de NTCs conectan con neuronas y dominios dendríticos específicos dentro del microcircuito cortical, y por tanto, puede haber diferencias estructurales a nivel de la sinapsis, así como, mecanismos de transducción sináptica diferentes (Viaene y cols., 2011).

### 3. LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL

El término ‘sinapsis’ fue originariamente introducido hace más de 100 años por Sir Charles Scott Sherrington (Sherrington, 1897) y fue posteriormente adoptado por Santiago Ramón y Cajal. Procede de la palabra *sinapteína* que Sherrington y colaboradores formaron con las palabras griegas *sin*, que significa "juntos", y *hapteína*, "con firmeza", para referirse a la “unión” entre neuronas. Sin embargo, desde la introducción de la microscopía electrónica y otras técnicas con resolución subcelular, el conocimiento sobre esta estructura se ha incrementado de manera exponencial en los últimos 50 años. La sinapsis es una unión intercelular especializada entre una neurona presináptica y una postsináptica. La información llega al terminal presináptico en forma de potencial de acción y es transmitido a la célula postsináptica a través de los neurotransmisores liberados desde las vesículas sinápticas localizadas en el terminal presináptico. El neurotransmisor es liberado a la hendidura sináptica, de forma calcio dependiente, donde se activan los receptores en la membrana postsináptica (Gray, 1963), y así, se produce un potencial postsináptico que permite la transmisión de la información de forma precisa.

Además, estudios electrofisiológicos, han aportado con gran detalle la función de la sinapsis, así como la gran plasticidad que posee. Aunque la sinapsis ha sido estudiada desde varios puntos de vista dando lugar a numerosas publicaciones, su morfología detallada, así como los parámetros cuantitativos que definen la estructura de sus elementos está, a día de hoy, limitada a un pequeño número de sinapsis, como la sinapsis

tálamo-cortical (STC), y además, su estudio ha sido abordado con diferentes metodologías, lo que complica la comparación de los datos existentes en la literatura.

### **3.1. La Sinapsis Tálamo-Cortical como Modelo de Eficacia Sináptica**

Muchos estudios, sobre todo electrofisiológicos, han abordado el tema de la STC, confirmando que es altamente eficaz, además de transmitir información con una gran precisión espacial y temporal (Castro-Alamancos y Connors, 1997; Brecht y Sakmann, 2002; Petreanu y cols., 2009). Aunque se estima que en la capa 4 cortical sólo el 5-20% de las sinapsis excitatorias proceden del tálamo (Benshalom y White, 1986; White y Keller, 1987; Peters y Payne, 1993), la STC tiene una probabilidad de liberación 1,5 veces mayor que la CC (Gil y cols., 1999). Muchos han sido los que han querido aclarar la cuestión de la alta eficacia de la STC si los TCAs sólo representan un bajo porcentaje del total de sinapsis corticales, por tanto, estudios electrofisiológicos han propuesto que la eficacia de la STC reside en su convergencia en la conexión con neuronas corticales, provocando un patrón sincrónico de disparo haciendo que estas neuronas respondan con una alta probabilidad (Bruno y Sakmann, 2006; Schoonover y cols., 2014). Sin embargo, experimentos electrofisiológicos *in vitro* han comprobado que con una mínima estimulación eléctrica de las NTCs de forma individual, se registra una respuesta cortical potente (Stratford y cols., 1996; Gil y cols., 1999). Otra hipótesis sería la de asumir que la STC es débil originalmente pero que posteriormente es amplificada por conexiones recurrentes intracorticales que le proveen una retroalimentación o ‘feedback’ positivo durante el estímulo sensorial, reforzando así la respuesta de la neurona cortical frente a la entrada o ‘input’ talámico (Douglas y cols., 1995; Lübke y cols., 2000). Por tanto, la eficacia de la STC, podría depender tanto de la convergencia espaciotemporal de múltiples axones talámicos en una misma neurona cortical, como residir en las propiedades intrínsecas de la STC.

Existe una evidencia clara de que la STC opera a través del aminoácido excitador glutamato, ya que posee una alta concentración del mismo en todas las áreas corticales (Kharazia y Weinberg, 1994). Diversos experimentos electrofisiológicos con registros extra- e intracelulares han demostrado que aplicando de forma local antagonistas de glutamato, se bloquea la respuesta de las neuronas corticales inducida por estimulación sensorial o eléctrica de los TCAs (Tsumoto y cols., 1986; Hagihara y cols., 1988; Hicks

y cols., 1991; Salt y cols., 1995), donde el glutamato es liberado en la corteza cerebral de una forma calcio dependiente (Tamura y cols., 1990). Además, se ha comprobado que las NTCs son inmunoreactivas para la forma fosforilada de la glutaminasa, enzima de síntesis de dicho aminoácido (Kaneko y Mizuno, 1988).

Además de la STC, la inmensa mayoría de las conexiones del cerebro son glutamatérgicas. Sin embargo, lejos de ser todas iguales, se han descrito dos grandes categorías anatómo-funcionales diferentes. Uno de los sitios donde esta clasificación ha sido mejor estudiada es precisamente el tálamo. Estas dos clases han dado en llamarse directriz (“driver”), que impone cambios cualitativos en la conducta de la neurona postsináptica, y moduladora (“modulator”), que representa la vía de modificación de la información vehiculada (Sherman y Guillery, 2006; 2011). Cada una de ellas correlaciona con un conjunto de rasgos característicos (Tabla 1).

**Tabla 1. Propiedades de las vías directriz y modulador (modificado de Sherman y Guillery, 2011)**

<b>Directriz</b> (ej. vía retinotalámica)	<b>Modulador</b> (ej. proyección corticotálámica desde capa VI)
Evocan potenciales postsinápticos excitatorios amplios	Evocan potenciales postsinápticos excitatorios pequeños
Depresión por pares o trenes de pulsos	Facilitación por pares o trenes de pulsos
Activación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos	Activación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos
Menor convergencia espacial	Mayor convergencia espacial
Árboles axónicos densos	Árboles axónicos dispersos
Axón grueso	Axón fino
Campos terminales amplios	Campos terminales pequeños
Contacto sináptico próximo al soma	Contacto sináptico alejado del soma

La diferencia entre directriz y modulador fue introducida específicamente para el relevo talámico, aunque, a día de hoy, es desconocida la distribución exacta de estos terminales en los distintos núcleos talámicos. Esta distinción podría también ser aplicada a las sinapsis glutamatérgicas de otros núcleos que todavía no han sido explorados, así como a la corteza cerebral (Sherman y Guillery, 2011; Rovó y cols., 2012). Sin embargo, no está clara la distribución de estos dos tipos de sinapsis glutamatérgicas en cuanto a la STC



procedente de distintos núcleos talámicos, y si por tanto, las diferencias entre estos dos tipos de sinapsis implicarían diferencias en la eficacia sináptica.

El grupo de Kevan A. C. Martin, en Suiza, ha sido uno de los más relevantes en el estudio de la STC, utilizando como modelo el sistema visual de gato. Ellos han demostrado que el número de sinapsis desde el núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN) a la corteza visual primaria (V1), una vía de relevo sensorial claramente directriz, es una pequeña fracción del total, y que además estas se localizan distales al soma de la neurona cortical, que el tamaño de la sinapsis no es especialmente grande, que no muestran una tendencia espacial convergente y que sus espinas dendríticas diana no poseen especializaciones morfológicas que las diferencie de otras espinas (da Costa y Martin, 2011); por lo que en principio, no mostraría todas las características típicas de una vía de tipo “driver” (véase Tabla 1). Por tanto, ellos han sugerido que la alta eficacia de la STC reside en una convergencia temporal del impulso, es decir, las STCs, aunque pocas, serían suficientes para producir una respuesta cortical gracias a la sincronización temporal del disparo de las NTCs; aunque también necesitarían una activación cortical previa para producir una respuesta (Douglas y Martin, 2007; Wang y cols., 2010; da Costa y Martin, 2011). Uno de los últimos estudios más completos sobre este tema realizado recientemente ha mostrado que la STC y la sinapsis CC son igual de eficaces de manera individual, por lo que la diferencia radicaría en la convergencia espacial de la conexión y en la sincronía temporal del impulso de la STC, apoyando así los estudios de Martin y colaboradores (Schoonover y cols., 2014). Sin embargo, es muy posible que la eficacia sináptica de los TCAs esté sujeta también a otros factores como el patrón específico que estos presentan al arborizar en la corteza (Ferster y cols., 1996), el control sobre la inhibición llevada a cabo por interneuronas corticales (Agmon y Connors, 1992; Swadlow, 1995; Gil y Amitai, 1996) y el reclutamiento de circuitos intracorticales excitadores (Castro-Alamancos y Connors, 1997).

Sin embargo, todas estas hipótesis fundamentalmente basadas en estudios funcionales, no han podido determinar hasta qué punto la eficacia de la STC está determinada por su estructura y características intrínsecas, ya que no se tienen datos cuantitativos detallados de la ultraestructura de la STC, así como una reconstrucción tridimensional de los elementos que participan en ella, lo que arrojaría más luz sobre las teorías propuestas para explicar la eficacia de esta. Además, la mayoría de los estudios se han centrado en el

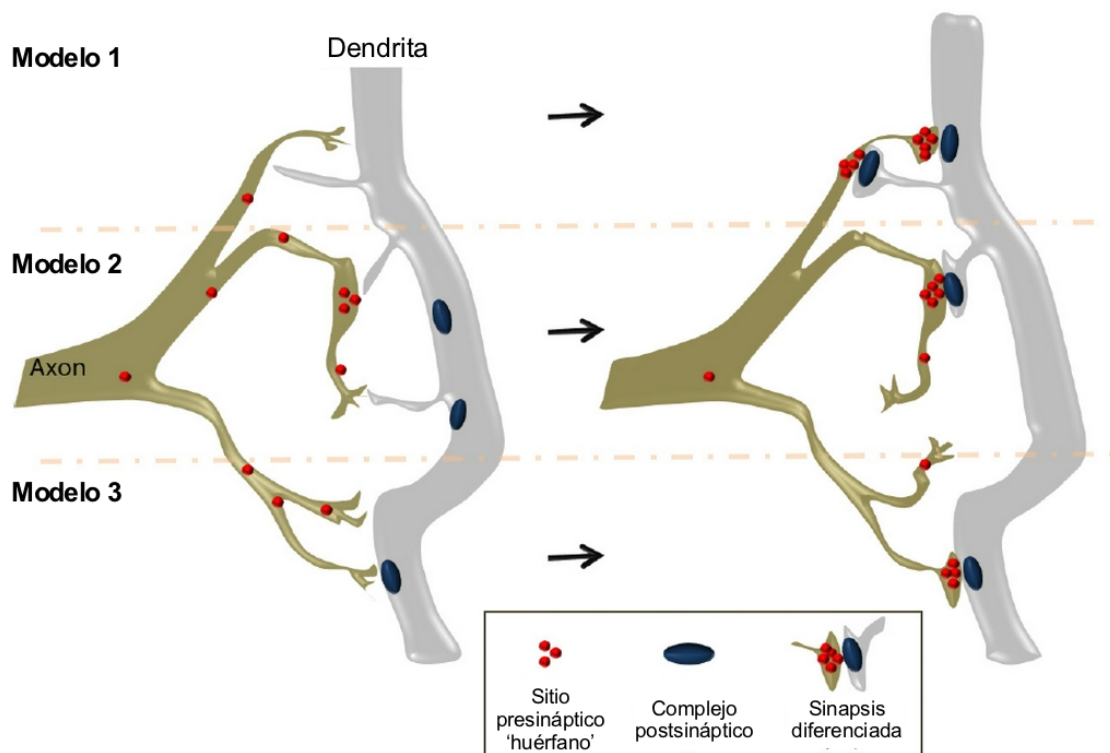
estudio de la STC de NTCs específicas, por lo que apenas se ha descrito la sinapsis de otras NTCs como, por ejemplo, las multiespecíficas.

### **3.2.El Estudio de la Microestructura de la Sinapsis Tálamo-Cortical. El Botón Sináptico.**

La relación entre anatomía y función en la STC no está clara. El abordaje de la morfología detallada de la sinapsis sólo es posible a nivel ultraestructural con microscopía electrónica, por tanto, habría que analizar detalladamente los diferentes elementos implicados en ella, es decir, analizar los elementos pre- y postsináptico, además de los componentes subcelulares que poseen. Además, la respuesta fisiológica también podría estar influida por los tipos celulares y/o dominios subcelulares diana con los que establecen contacto los TCAs. Por tanto, la estructura de la STC dependerá, en última instancia, del núcleo talámico y del área cortical implicada, incluso podría depender también de la especie animal estudiada.

El elemento presináptico de la STC es, en la mayoría de los casos, una dilatación axónica pronunciada llamada botón sináptico, también denominado varicosidad axónica o sinaptosoma. Estos botones sinápticos se encuentran en la región amielínica del axón y se manifiestan como un ensanchamiento del axón de tipo esferoideo dado por la acumulación en su interior de vesículas sinápticas y, en muchos casos, de una o varias mitocondrias. Suele presentar también una o varias zonas activas sinápticas (Peters y Palay, 1991). El número de botones sinápticos en un axón es muy alto, tanto es así, que estos le dan al axón un aspecto arrosariado. Durante el desarrollo, los axones se proyectan hacia sus regiones diana para establecer conexiones sinápticas. Debido a diversas señales químicas, porciones indiferenciadas del axoplasma forman los botones sinápticos, que, en un primer momento, se componen sólo de un grupo estable de vesículas sinápticas y de una zona activa sináptica. Toda esta maquinaria sináptica se transporta simultáneamente de manera específica a lo largo del axón. Se han propuesto varios modelos para explicar la formación del botón sináptico (Figura 3): un primer modelo sería que los elementos pre- y postsináptico establecerían contactos de adhesión celular que se diferenciarían posteriormente en contactos sinápticos; un segundo modelo sería que los componentes presinápticos se acumularían en zonas del axón (sitios presinápticos ‘huérfanos’) que constituirían zonas preferentes para formar contactos sinápticos; y en un

tercer modelo, aparecerían primeramente complejos postsinápticos activos en las dendritas diana que favorecerían el contacto y la formación del botón presináptico (Ahmari y cols., 2000; Friedman y cols., 2000; Okabe y cols., 2001; Bresler y cols., 2004; revisado por Pinto y Almeida, 2016).



**FIGURA 3: Esquema de los diferentes modelos de la formación de la sinapsis axo-dendrítica.** Modificado de Pinto y Almeida (2016)

Recientemente, se han conseguido aislar y analizar botones sinápticos de la corteza cerebral y del cerebelo, conjuntamente, de ratas adultas, obteniéndose unos parámetros morfológicos generales de los mismos. Así, se ha definido que un “botón sináptico tipo” tiene un volumen medio de  $0,37 \mu\text{m}^3$ ; una superficie media de  $2,31 \mu\text{m}^2$ ; 384 vesículas sinápticas de media; un volumen mitocondrial medio de  $0,12 \mu\text{m}^3$  y un área de densidad presináptica media de  $0,07 \mu\text{m}^2$  (Wilhelm y cols., 2014). Sin embargo, no está claro, si estos parámetros morfológicos variarían en otros tipos neuronales, y hasta qué punto estarían implicados en la eficacia de una determinada sinapsis, por ejemplo en el circuito establecido entre los diferentes núcleos talámicos y las diversas áreas de la corteza cerebral.

Los primeros estudios de microscopía electrónica que abordaron la STC usaron el método de degeneración anterógrada de axones inducida por lesión (Colonnier, 1964), para visualizar botones sinápticos TCs específicos. Los terminales en degeneración eran identificables por el aumento de su densidad al microscopio electrónico, por lo que se pudo describir la STC y, los elementos que la forman, de forma cualitativa (Jones y Powell, 1970; Garey y Powell, 1971; Peters y cols., 1977; White, 1978; Davis y Sterling, 1979; White y Rock, 1979; Hersch y White, 1981). Sin embargo, esta técnica de degeneración axonal comprometía la obtención de datos cuantitativos sobre la estructura de los elementos implicados en la sinapsis, ya que en el momento en el que los terminales podían ser visualizados poseían una morfología alterada, y además, los elementos que formaban la sinapsis ya habían sido fagocitados (White, 1978; 1989; Shanks and Powell, 1981). Por tanto, la aplicación de esta técnica impidió el análisis detallado de la ultraestructura del botón sináptico. Sin embargo, con la introducción de los trazadores anterógrados, se volvió a retomar el estudio de la STC mediante el trazado de TCAs con PHA-L o dextrano para analizar detalladamente los terminales intactos. Además, mediante corte seriado al ultramicrotomo, se han podido seguir axones marcados y reconstruir de manera fiable una parte de los mismos (White y cols., 2004).

Como ya se ha descrito, las NTCs de tipo específico inervan de manera focal la capa 4 de las cortezas sensoriales primarias. Debido a su importancia funcional y su morfología aparentemente más sencilla, su sinapsis ha sido la más estudiada a nivel ultraestructural, sobre todo, en el sistema visual y somatosensorial. Se han realizado experimentos, con trazadores anterógrados y posterior análisis de la STC en botones sinápticos marcados, obteniéndose el diámetro o el área de proyección máxima de estos botones, y el número y tamaño de las mitocondrias dentro del botón (Cunningham y Levay, 1986; Lu y Lin, 1993; Staiger y cols., 1996; White y cols., 2004; Anderson, 2009; da Costa y Martin, 2011; Smith y cols., 2012). Estos estudios se han basado en imágenes de microscopía electrónica haciendo un análisis bidimensional, por lo que han mostrado que los botones de origen talámico son relativamente grandes, y además, de mayor tamaño que los correspondientes a colaterales axónicas de neuronas piramidales de la capa 6 y de axones de neuronas espinosas estrelladas de la propia capa 4 (Ahmed y cols. 1994; Feldmeyer y cols., 1999; Binzegger y cols., 2004), confirmando así la correlación entre tamaño y mayor eficacia sináptica vista por Gil y cols., 1999. Estos estudios han sido llevados a cabo en varias especies animales (ratón, rata, gato, macaco y tupaya), así como en

diferentes núcleos talámicos, fundamentalmente de tipo “específico” (VP, dLGN, núcleo geniculado medial (MGN), núcleo ventral lateral (VL), núcleo mediodorsal (MD), etc.), por lo que se puede extraer de ellos que el diámetro de los botones sinápticos TCs varía dentro del rango de 0,5-2  $\mu\text{m}$ , con un área de proyección máxima comprendida entre 0,4-0,9  $\mu\text{m}^2$  (Keller y cols., 1985; Staiger y cols., 1996; Kuroda y cols. 1998; Latawiec y cols., 2000; White y cols., 2004; Negyessy y Goldman-Rakic, 2005; Anderson y cols., 2009; da Costa y Martin, 2009; Chomsung y cols., 2010; Smith y cols., 2012; Familtsev y cols., 2016). Las variaciones en el tamaño de los botones sinápticos, entre los diferentes estudios, también pueden ser debidas a los propios métodos, ya que, a día de hoy, no hay una metodología estandarizada para la obtención de datos cuantitativos de la ultraestructura de los elementos pre- y postsináptico, ni de los componentes subcelulares que contienen. Además, ninguno de estos estudios mencionados, ha podido dar datos cuantitativos volumétricos ya que no han realizado reconstrucciones tridimensionales de los terminales ni de los elementos postsinápticos con los que establecen contacto.

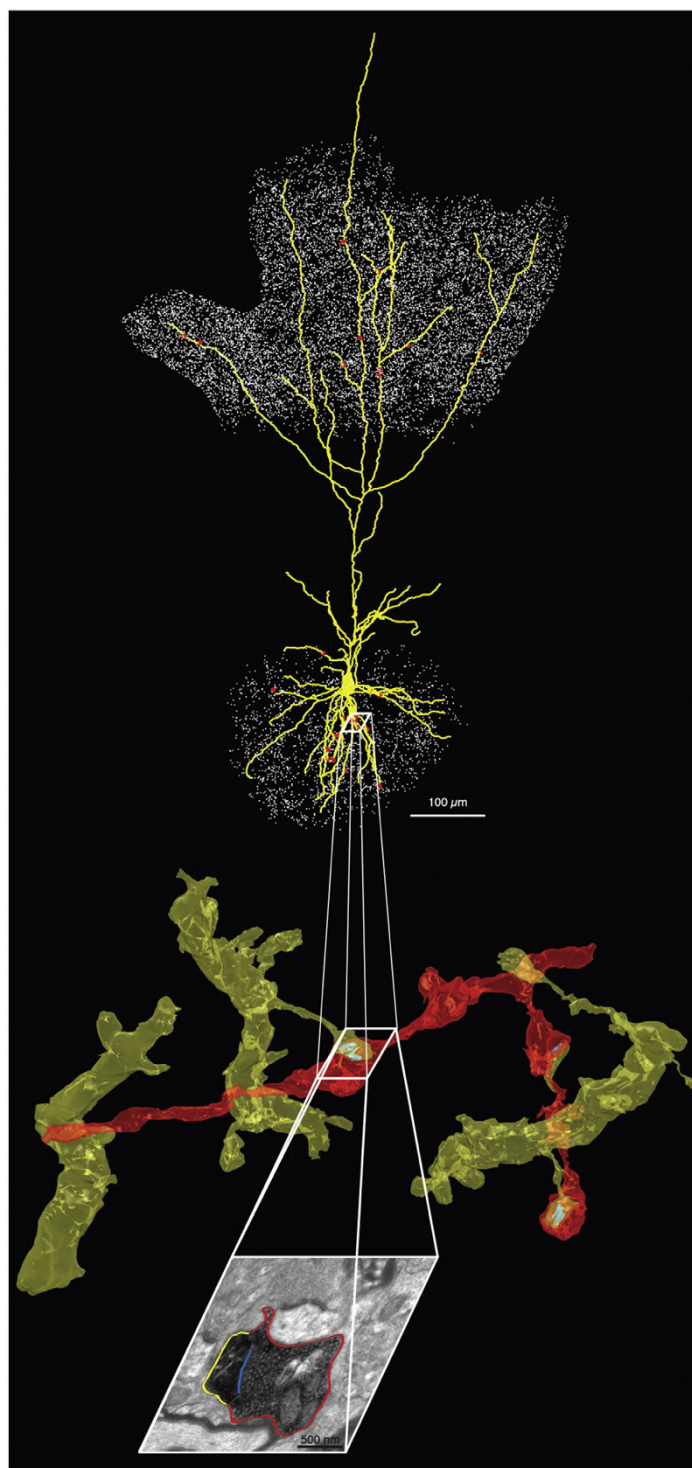
En los últimos años se han desarrollado programas informáticos para solventar este problema, ya que permiten, a partir de corte seriado ultrafino, hacer reconstrucciones tridimensionales de los elementos observados bajo el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Gracias a programas, como *Reconstruct* (Fiala, 2005), *OpenCAR* (Sätzler y cols., 2002), o *EspINA* (Morales y cols., 2011), a partir de fotografías seriadas de estos cortes, se han podido reconstruir tridimensionalmente los elementos de la sinapsis, y por tanto, obtener datos cuantitativos de los elementos que forman la sinapsis de forma completa (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016). Recientemente ha sido publicado un estudio de la ultraestructura de la STC por Bopp y colaboradores (2017) en el que comparan la morfología de los botones TCs, tanto en la corteza somatosensorial primaria (S1) como en corteza motora primaria (M1), identificándolos con tinción inmunohistoquímica del transportador de glutamato tipo 2 (vGLUT2) que se encuentra en terminales axónicos procedentes del tálamo. Gracias al corte seriado ultrafino y posterior reconstrucción tridimensional de los elementos que participan en la sinapsis, han determinado un volumen medio de 0,31  $\mu\text{m}^3$  para los botones en S1, y de 0,17  $\mu\text{m}^3$  para los botones de M1. Además, han comparado dichos volúmenes con los obtenidos para botones vGLUT2 negativos, presumiblemente CCs, y no han encontrado diferencias significativas, poniendo de manifiesto que ambos tipos de botones poseen un tamaño

similar, y sugiriendo por tanto, que el tamaño del botón sináptico no estaría relacionado con la eficacia sináptica (Bopp y cols., 2017). Otros dos estudios publicados recientemente por un mismo grupo han analizado botones sinápticos en capas 2-3 de las cortezas V1 y prefrontal de ratón y macaco, obteniendo un volumen medio de  $0,1 \mu\text{m}^3$  para los botones de ambas cortezas en ratón, y un volumen medio de  $0,15 \mu\text{m}^3$  en V1 y  $0,3 \mu\text{m}^3$  en corteza prefrontal en macaco (Medalla y Luebke, 2015; Hsu y cols., 2017). Por tanto, se observa una gran diversidad en el tamaño de los botones sinápticos tanto en diferentes áreas y capas corticales como en distintas especies animales.

Además, en los últimos años, se han desarrollado nuevos microscopios electrónicos buscando la manera de evitar el corte seriado ultrafino por su dificultad manual y por la gran cantidad de tiempo que lleva realizarlo. Uno de estos microscopios es el microscopio de barrido de corte seriado automático (ATUM-SEM), que consiste en un corte seriado automático con cuchilla de diamante, donde los cortes ultrafinos son recogidos en una cinta transportadora que los lleva directamente al microscopio electrónico de barrido (SEM) para ser escaneados (Denk y Horstman, 2004). Sin embargo, el microscopio que ha conseguido eliminar completamente el corte seriado ha sido el FIB/SEM, que combina un haz de iones galio focalizado sobre la muestra (FIB) con un SEM; el resultado es un fotografiado seriado automático de la muestra, de apariencia de microscopía de transmisión, que, tras tomar la fotografía, el haz de iones elimina un volumen de grosor específico. El resultado es un bloque de imágenes seriadas y alineadas, de la longitud deseada, que permite posteriormente el análisis detallado de la ultraestructura del tejido (Knott y cols., 2008; Merchan-Perez y cols., 2009; Bosch y cols., 2015).

Por tanto, toda esta nueva tecnología hace posible realizar reconstrucciones tridimensionales para poder analizar detalladamente la microestructura del botón sináptico, de la sinapsis, de los elementos subcelulares que intervienen en ella, y de los elementos postsinápticos con los que establece contacto, y así poder arrojar luz sobre los datos funcionales obtenidos relativos a la eficacia sináptica. Además, el estudio de circuitos a nivel ultraestructural es esencial para el estudio de la conectómica con resolución celular, para así relacionar las diferentes vías que conforman las proyecciones axónicas de neuronas identificadas (escala mesoscópica), con las características, tanto

estructurales como funcionales, de sus contactos sinápticos (escala microscópica) (Figura 4) (Helmstaedter, 2013).



**FIGURA 4:** Esquema ilustrativo de la correlación entre la microscopía óptica (escala mesoscópica) y electrónica (escala microscópica). Tomado de da Costa y Martin (2013)



### **3.3.Los Elementos del Botón Sináptico: Densidad Presináptica, Mitocondria y Vesículas Sinápticas**

El botón sináptico se encuentra asociado a una serie de elementos subcelulares tales como la densidad presináptica, una proporción variable de vesículas sinápticas donde se acumula el neurotransmisor antes de ser liberado, y la aparición, en numerosos casos, de mitocondrias en dicho elemento. Ello determina que el elemento presináptico o varicosidad axónica sea denominado botón sináptico. Todos estos elementos asociados a la sinapsis serían responsables tanto de su función como de su relativa eficacia, que en última instancia dependería de los tipos neuronales entre quienes se forma el contacto sináptico; por lo que las sinapsis no sólo transmiten la información, sino que la transforman, convirtiéndose así en los elementos básicos del procesamiento neuronal (Koester y Johnston, 2005).

#### **3.3.1. La densidad presináptica**

La densidad presináptica está compuesta por una matriz proteica heterogénea, tanto en composición como en tamaño, cuya función es anclar las vesículas sinápticas próximas a ella y reclutar canales iónicos de calcio para que se pueda llevar a cabo la liberación del neurotransmisor a la llegada de un potencial de acción. Por tanto, la exocitosis del neurotransmisor está restringida a una pequeña región de la membrana presináptica, la zona activa, caracterizada ultraestructuralmente por material electron-denso que conforma la densidad presináptica (Gray, 1963; Couteaux y Pecot-Dechavassine, 1970). En determinados casos, la morfología de la densidad presináptica no es continua, sino que el material electrón-denso aparece dividido por pequeñas perforaciones o espacios claros. La existencia de estas perforaciones fue inicialmente descrita por Akert y colaboradores (1972). Se postuló que dichas perforaciones podrían ser importantes para el anclaje de las vesículas sinápticas (Akert y cols., 1972; Triller y Korn, 1985). Además, la densidad presináptica también está implicada en procesos de plasticidad y potenciación a corto y largo plazo (Südhof, 2012).

Pocos estudios han obtenido datos sobre la morfología y el tamaño de la densidad presináptica en la STC, ya que la mayoría de ellos han abordado su ultraestructura a partir de la identificación del elemento presináptico por marcado anterógrado o



inmunohistoquímica, quedando la densidad presináptica enmascarada. Un estudio de microscopía electrónica reciente, en rata, sobre los cambios de la sinapsis en la capa 4 de S1 durante el desarrollo postnatal, estimó que el área media de la densidad presináptica (tanto en botones TCs como CCs) era de  $0,27 \mu\text{m}^2$  en adulto, y similar durante todo el desarrollo postnatal. Sin embargo, observaron que aunque el tamaño se mantenía constante, la proporción de densidades presinápticas de tipo perforada aumentaba hasta un 32% más en adulto (Dufour y cols., 2016).

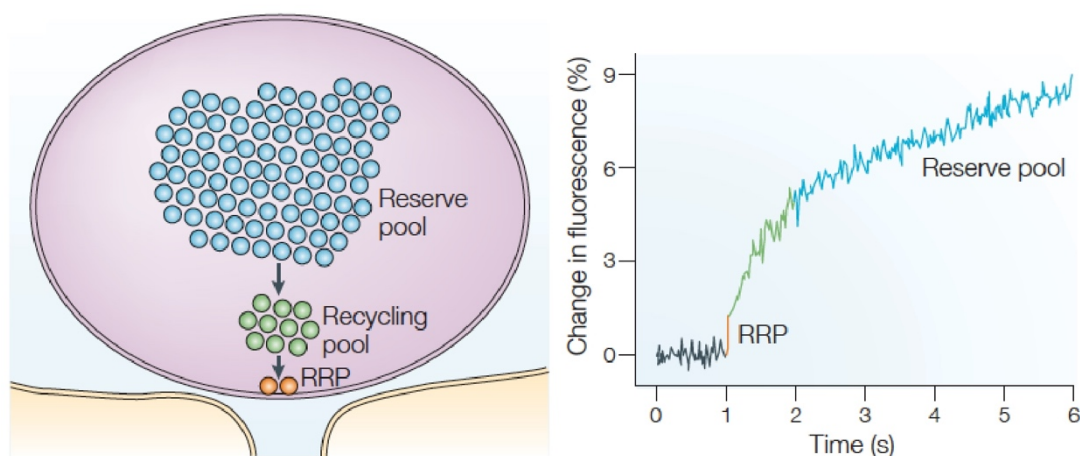
### **3.3.2. La mitocondria**

Otro elemento presente en la mayoría de los botones sinápticos es la mitocondria. Se ha descrito que el volumen mitocondrial representa alrededor del 20% del volumen total del botón sináptico, tanto en botones TCs como CCs (Rollenhagen y cols., 2015; Bopp y cols., 2017). Se encuentra además siempre íntimamente asociada con las vesículas sinápticas (Rowland y cols., 2000; Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016; Smith y cols., 2016). La función mitocondrial no sólo se ha asociado con la generación de energía, sino también con la regulación de los niveles de calcio dentro del terminal y con la acumulación de estos iones (Pozzan y cols., 2000; Rizzuto y cols., 2000; Perkins y cols., 2010). Además, se ha observado que las mitocondrias son orgánulos subcelulares muy móviles dentro de las neuronas (Mironov, 2006; Mironov y Symonchuk, 2006), y probablemente están involucradas en la movilización de las vesículas sinápticas que se encuentran más lejos de la zona activa (Verstreken y cols., 2005; Perkins y cols., 2010; Smith y cols., 2016). Todas estas funciones asociadas a la mitocondria la convierten en un elemento clave en la eficacia sináptica.

### **3.3.3. Las vesículas sinápticas**

Dentro del botón sináptico el neurotransmisor se acumula en el interior de organelas esféricas densamente empaquetadas denominadas vesículas sinápticas. La mayoría de estas vesículas tienen un diámetro de 40 a 50 nm y un contenido agranular, lo que se denomina en microscopía electrónica vesículas de centro claro (Peters y Palay, 1991); aunque pueden aparecer también vesículas de mayor tamaño ( $>60$  nm) o de centro denso (Torrealba y Carrasco, 2004). El proceso de la sinapsis engloba la rápida fusión de la membrana de las vesículas con la membrana de la zona activa, la exocitosis del neurotransmisor a la hendidura sináptica, y posteriormente, la endocitosis vesicular del

neurotransmisor para su reutilización ('reciclaje' del neurotransmisor) (revisado por Südhof, 2012). Recientemente, se ha propuesto una clasificación de las vesículas que comparten características similares por grupos o 'pools' (Figura 5), por lo que dentro del conjunto total de vesículas sinápticas dentro del terminal presináptico se encontrarían dos subgrupos diferenciados: vesículas preparadas para liberarse (RRP) que se encuentran muy próximas ( $< 60$  nm) o ancladas a la membrana adyacente a la densidad presináptica, y vesículas de reciclaje que se encuentran entre 60-200 nm de distancia de la zona activa (Harris y Sultan, 1995; Rosenmund y Stevens, 1996; Alabi y Tsien, 2012). Además, se ha observado, tanto en terminales en corteza como en el hipocampo, que habría otro grupo más de vesículas sinápticas las cuales permanecen inmóviles incluso, en ocasiones, con una estimulación prolongada; este tercer grupo se denomina vesículas en reposo o de reserva, y se encuentran a más de 200 nm de distancia de la densidad presináptica (Harata y cols., 2001; Rollenhagen y cols., 2015). Sin embargo, la dinámica de estos 'pools' de vesículas sinápticas en el marco de la transmisión sináptica no está claramente definida a día de hoy, aunque se ha observado que la liberación de las vesículas de los diferentes 'pools' es dependiente de la duración del estímulo (Figura 5) (revisado por Rizzoli y Betz, 2005).



**FIGURA 5: Esquema de la distribución de los 'pools' de vesículas dentro de un botón (izquierda) y tiempo estimado de liberación de cada uno cuando se produce despolarización (derecha).** El cambio de fluorescencia en la gráfica indica la liberación vesicular. Tomado de Rizzoli y Betz (2005)

Se ha descrito que el número total de vesículas sinápticas dentro de un botón sináptico representa solamente el 4% del volumen total del botón (aproximadamente 400-500 vesículas) (Rollenhagen y cols., 2015; Wilhelm y cols., 2014; Dufour y cols., 2016),

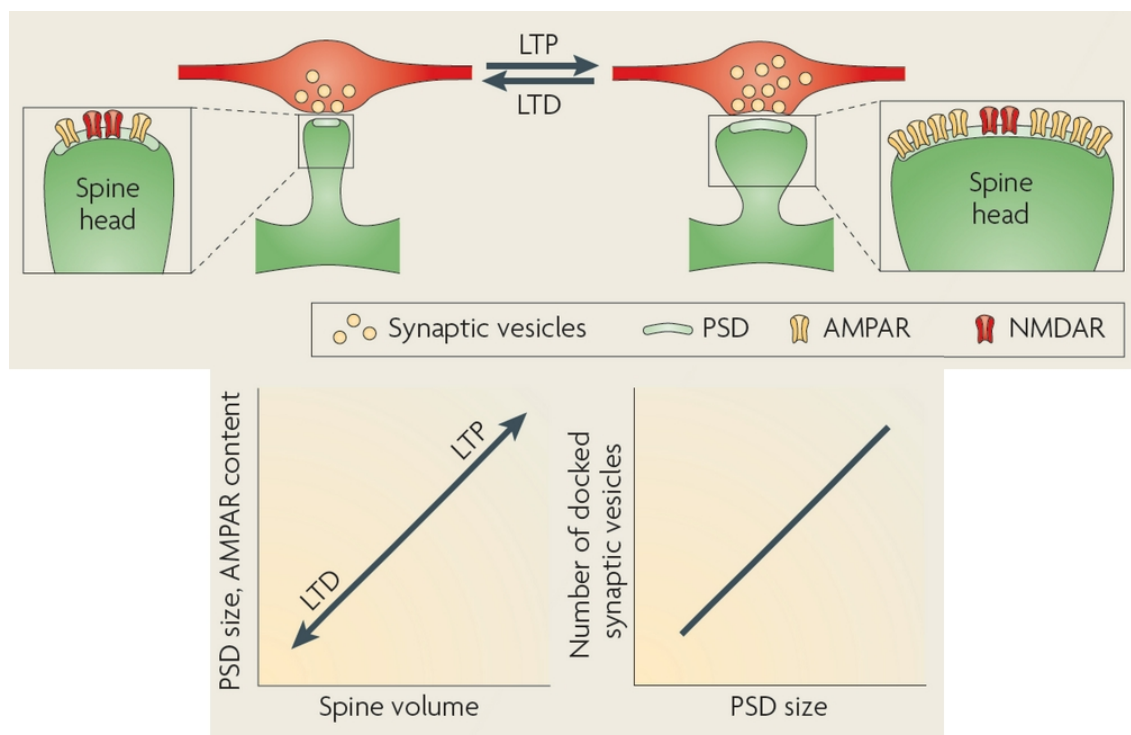
observándose variaciones, en dicho número, asociadas a sinapsis no perforadas y perforadas, siendo este número mayor en perforadas (Nava y cols., 2014). Sin embargo, el estudio de Bopp y cols. (2017) donde se analizaban botones sinápticos TCs en S1 y en M1, ha estimado una densidad de aproximadamente 5000 vesículas sinápticas por  $\mu\text{m}^3$ , por lo que los botones sinápticos procedentes del tálamo tendrían un número muy superior de vesículas sinápticas (~1600 vesículas/botón) y similar a lo observado en botones sinápticos de gran tamaño en el hipocampo (~1000 vesículas/botón) (Harris y Sultan 1995; Bourne y cols., 2013).

### **3.4.El Elemento Postsináptico: La Densidad Postsináptica**

La zona activa análoga a la densidad presináptica en el elemento postsináptico, donde se localizan los receptores de membrana, se denomina densidad postsináptica (PSD). La ultraestructura de la PSD se caracteriza por una acumulación de material electron-denso, más prominente que la densidad presináptica en sinapsis excitadoras (asimétricas), pero menos compleja (Peters y Palay, 1991). Posee un diámetro de 200-500 nm con un grosor de 30-60 nm (Harris y cols., 1992; Spacek y Harris, 1998); y está formada por proteínas del citoesqueleto, moléculas de señalización como calmodulinas, receptores de membrana, y proteínas de anclaje como la PSD-95 (Cho y cols., 1992). En la PSD de sinapsis glutamatérgicas se encuentran entre 20 y 300 receptores ionotrópicos de dos tipos: los N-metil-D-aspartato (NMDA) y los  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA); siendo estos últimos más abundantes (Okabe, 2007).

Además, se sabe, que en PSDs de mayor tamaño suelen aparecer también, de igual forma que en la densidad presináptica, agujeros o perforaciones. La existencia de estas perforaciones fue inicialmente descrita por Peters y Kaiserman-Abramof (1969). Se postuló que dichas perforaciones podrían desempeñar un papel importante en la liberación del neurotransmisor, o que por el contrario, eran un principio de división para la creación de nuevas sinapsis (Peter y Kaiserman-Abramof, 1969; Nieto-Sampetro y cols., 1982). Por tanto, de forma general, se han dividido también las PSDs en no perforadas y perforadas (Harris y cols., 1992). Estudios más recientes en hipocampo combinando microscopía electrónica con inmunohistoquímica con partículas de oro para el receptor AMPA, han observado una mayor expresión de dicho receptor en sinapsis perforadas,

sugiriendo que estas podrían estar relacionadas con la plasticidad sináptica, y por tanto, en último término, con una mayor eficacia sináptica (Ganeshina y cols., 2004; Nicholson y cols., 2006); ya que el tamaño de la PSD cambia con fenómenos de potenciación/depresión a largo plazo (LTP/LTD) (Figura 6) (revisado por Holtmaat y Svoboda, 2009) . Esta relación también se ha observado en sinapsis corticales (Nava y cols., 2014).



**FIGURA 6: Cambio en el tamaño de la PSD debido a fenómenos de LTP y LTD.** Nótese el aumento de tamaño de la PSD por reclutamiento de receptores AMPA y el consecuente aumento del tamaño de la espina dendrítica, todo ello asociado con un aumento de vesículas RRP. Tomado de Holtmaat y Svoboda (2009)

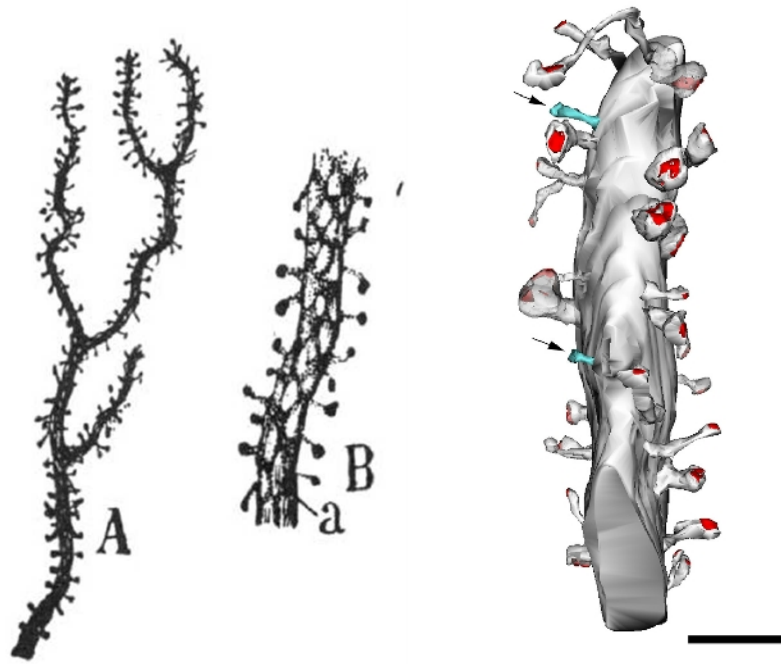
Diversos estudios de microscopía electrónica con reconstrucción tridimensional han obtenido el área de la PSD como parámetro importante en relación con la eficacia sináptica. Sin embargo, en la literatura, se encuentran diferentes formas de definir y medir dicha área. En este sentido, unos autores definen el área de la PSD como el contorno tridimensional completo del material electrón-denso adyacente a la membrana del elemento postsináptico (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016); mientras que otros autores definen el área de la PSD como la longitud de la interfaz sináptica en cada sección y multiplicada por el grosor de cada sección y el número de secciones en las que

aparece (Arellano y cols., 2007; Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017). Por tanto, el área del ‘contorno’ de la PSD suele corresponder aproximadamente con el doble del área de la ‘interfaz’.

En un análisis amplio de PSDs corticales, se ha observado que el área de la PSD (interfaz) varía dentro del rango de 0,01 a 0,33  $\mu\text{m}^2$  con un valor medio de 0,06  $\mu\text{m}^2$  para PSDs no perforadas y 0,17  $\mu\text{m}^2$  para perforadas (Arellano y cols., 2007). Por tanto, cabría pensar que el área de la PSD específicamente en las STCs estaría englobada dentro de las de mayor tamaño, sin embargo, los datos disponibles en la literatura muestran también una amplia variación (0,04-0,4  $\mu\text{m}^2$ ), dependiendo del área cortical de interés, del núcleo talámico del que recibe la aferencia, y de la especie animal estudiada, por ejemplo: 0,11  $\mu\text{m}^2$  en V1 de gato (da Costa y Martin, 2009); 0,04  $\mu\text{m}^2$  en S1, y 0,06  $\mu\text{m}^2$  en M1 de ratón (Bopp y cols., 2017); 0,4  $\mu\text{m}^2$  en corteza auditiva primaria de rata (Smith y cols., 2012), 0,08  $\mu\text{m}^2$  en V1 de ratón y macaco y prefrontal de ratón, y 0,11  $\mu\text{m}^2$  en corteza prefrontal de macaco (Medalla y Luebke, 2015; Hsu y cols., 2017), etc.

### **3.5.El Elemento Postsináptico: Espinas Dendríticas vs. Tallos Dendríticos**

Las dendritas son procesos neuronales procedentes del pericarion que se extienden, como ramas de un árbol, en todas las direcciones del espacio. Sus contornos suelen ser irregulares y presentan numerosas protuberancias o procesos. Una de las protrusiones dendríticas más estudiada a lo largo de los años desde que fueron descritas por Ramón y Cajal hace más de 100 años en las células de Purkinje del cerebelo de aves (Figura 7) (Ramón y Cajal, 1888), han sido las espinas dendríticas.



**FIGURA 7: Ilustración original de Cajal donde representa espinas dendríticas en una célula de Purkinje del cerebelo (izquierda). Reconstrucción tridimensional de una dendrita espinosa a partir de cortes seriados en microscopía electrónica (derecha).** Aparecen en rojo los contactos sinápticos y en azul, indicadas con flechas, las espinas dendríticas no sinápticas (Escala = 2000 nm). Tomado de Ramón y Cajal (1899) y de Arellano y cols. (2007)

Sin embargo, este hallazgo no estuvo libre de controversia, ya que otros autores contemporáneos a Cajal, como Kölliker y Golgi, pensaban que las espinas dendríticas eran artefactos de la propia tinción y por tanto, en sus escritos, dibujaban las dendritas sin estas estructuras (Kölliker, 1896). Aun así, Cajal mantuvo su postura, observando las espinas dendríticas utilizando diferentes tinciones y postulando que estas eran elementos importantes de la función neuronal (Ramón y Cajal, 1896). Finalmente, el trabajo de numerosos autores a lo largo de los años ha confirmado que las espinas dendríticas son elementos esenciales en sinapsis excitadoras en la corteza cerebral, además de tener un importante papel en numerosos procesos cognitivos, así como en el aprendizaje y la memoria (Figura 7) (Yuste, 2011; DeFelipe, 2015).

Generalmente, las espinas dendríticas están compuestas por un extremo ensanchado llamado cabeza de la espina, donde típicamente se encuentra el contacto sináptico y por tanto la PSD, y un proceso más fino que une la cabeza al tallo dendrítico llamado cuello de la espina (Yuste, 2011). Las espinas dendríticas son esenciales para la función de la corteza cerebral, ya que son el elemento postsináptico diana más frecuente de las sinapsis

excitadoras (Colonnier, 1968), aunque en neuronas no espinosas, estas sinapsis se dan el propio tallo dendrítico. Por tanto, cabe pensar que las espinas dendríticas tengan que desempeñar una función especial ya que no son una estructura esencial para que se forme una sinapsis. Se han descrito numerosas funciones para las espinas dendríticas, desde aislar los contactos sinápticos y filtrar potenciales de membrana, y además estar implicadas en la homeostasis del calcio, hasta ser elementos esenciales en procesos como el aprendizaje y la memoria (Yuste y Denk, 1995; Yuste y cols., 2000; Araya y cols., 2006; Arellano y cols., 2007).

Las espinas dendríticas varían en tamaño y forma, incluso las pertenecientes a una misma neurona. Ya en los años 70, gracias a la microscopía electrónica, se propuso una clasificación morfológica de las espinas en fina o filopodio, gruesa y champiñón, teniendo en cuenta también la aparición de morfologías intermedias (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970). Esta clasificación fue adoptada por la comunidad científica y se mantiene actualmente. Durante el desarrollo cortical, las espinas muestran una forma elongada y fina que gradualmente va cambiando a la estructura de ‘champiñón’ en la mayoría de los casos (Harris y cols., 1992). Además, parece que existe una correlación positiva entre el volumen de la cabeza de la espina y el área de la PSD, y por tanto, con una mayor eficacia sináptica (Harris y cols., 1992; Matsuzaki y cols., 2001; Arellano y cols., 2007; Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017); aunque no se ha observado correlación entre la longitud del cuello de la espina y el área de la PSD (Arellano y cols., 2007). Por otra parte, numerosos estudios han mostrado que las espinas dendríticas son muy móviles y plásticas. En cortezas sensoriales, esta movilidad parece estar regulada por la experiencia sensorial y disminuye con la edad (Lendvai y cols., 2000; Majewska y Sur, 2003). Se ha observado que esta movilidad relativa de las espinas estaría marcada estructuralmente por un orgánulo especializado, con forma de retículo endoplásmico, localizado en el interior de las espinas llamado aparato de la espina (Konur y Yuste, 2004; Holtmaat y cols., 2005; Umeda y cols., 2005). Dicho aparato de la espina aparece con frecuencia en espinas dendríticas corticales (Rollenhagen y cols., 2015), sin embargo, sólo una pequeña fracción (~30%) de las espinas dendríticas de neuronas del hipocampo, concretamente en la región CA1, contienen aparato de la espina (Harris y Sultan, 1995; Marrone y cols., 2005).



Aunque parece que las espinas dendríticas son un elemento esencial en la eficacia relativa de la sinapsis, numerosos estudios con microscopia electrónica que han abordado la STC, no han obtenido datos cuantitativos relativos al volumen de la cabeza de la espina o a la longitud del cuello. Estos estudios, solamente han definido que los botones TCs establecen sinapsis en un alto porcentaje con espinas dendríticas frente a tallos dendríticos (80% vs. 20%) (Cunningham y Levay, 1986; Lu y Lin, 1993; Kharazia y Weinberg, 1994; Staiger y cols., 1996; White y cols., 2004; Anderson, 2009; da Costa y Martin, 2011; Smith y cols., 2012). Sin embargo, estudios más recientes sí han estimado las medidas relativas a las espinas dendríticas tales como, el volumen de la cabeza de la espina y la longitud del cuello de la espina, comprendidos en los rangos de 0,01-0,3  $\mu\text{m}^3$  y 0,1-2,21  $\mu\text{m}$  respectivamente (Arellano y cols., 2007).

La diana preferente de los TCAs son las espinas dendríticas, y por tanto, presumiblemente, neuronas corticales excitadoras; sin embargo, hay que tener en cuenta que el 20% de las STCs son sobre tallos dendríticos y, por tanto, la diana podrían ser neuronas inhibitorias. Un estudio llevado a cabo en la corteza de barriles de S1 (S1BF) de rata que combinaba inyección de PHA-L en el núcleo ventral posteromedial (VPM) talámico con inmunohistoquímica pre-inclusión contra parvoalbúmina (proteína ligadora de calcio específica de interneuronas de disparo rápido) e inmunohistoquímica post-inclusión de partículas nanométricas de oro contra el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio, para así identificar las interneuronas, observaron que sólo el 8,2% de los terminales marcados con PHA-L establecían sinapsis con perfiles postsinápticos positivos para GABA; sin embargo las neuronas parvoalbúmina positivas recibían múltiples contactos sinápticos de botones procedentes del VPM. Por tanto, parece que las interneuronas responsables de la inhibición perisomática de las neuronas estrelladas espinosas (SSCs) de capa 4 (interneuronas parvoalbúmina positivas: interneuronas en cesta) serían fuertemente excitadas por la aferencia talámica (Staiger y cols., 1996). Esto sugiere que la STC sobre neuronas inhibitorias podría ser muy efectiva ya que dicha sinapsis ocurre en el soma o en dendritas proximales, y que por tanto estos contactos desencadenarían una inhibición por antealimentación (*feedforward inhibition*) de neuronas corticales, participando así en las etapas tempranas del procesamiento de la información sensorial (Keller y White, 1987; Staiger y cols., 1996; Porter y cols., 2001; Swadlow, 2003; Cruikshank y cols., 2007; Staiger y cols., 2009).



#### 4. LA CORTEZA DE BARRILES DEL RATÓN COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL

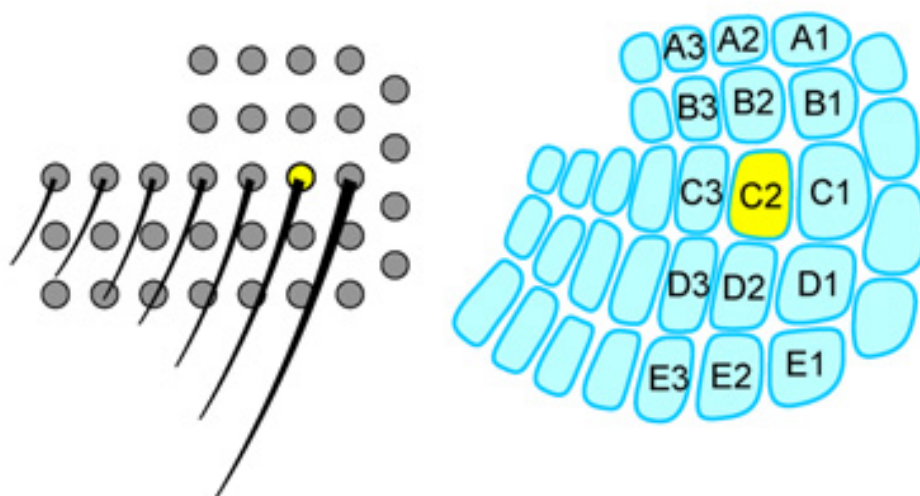
Los roedores poseen unos apéndices especializados en localizar y discriminar objetos de su entorno llamados vibrisas. Este sistema de vibrisas se ha convertido en un modelo muy popular para estudios de desarrollo, de plasticidad neuronal, de aprendizaje, de integración sensorimotora, y de, incluso, estudios enfocados en robótica y modelos neuronales predictivos. En este sistema de información somatosensorial, las regiones que han atraído el interés de muchos investigadores han sido el complejo trigeminal troncoencefálico, el tálamo somatosensorial, y la corteza S1 (Deschênes y cols., 2005; Petersen, 2007; Diamond y cols., 2008; Bosman y cols., 2011).

A principios de los años 70, Woolsey y Van der Loos describieron una región específica localizada en la corteza S1, donde las vibrisas de roedores estaban topográficamente representadas en unidades citoarquitectónicas discretas, concretamente en la capa 4, que denominaron ‘barriles’ (Woolsey y Van der Loos, 1970). Gracias a la teoría introducida unos años antes por Vernon Mountcastle sobre la ‘columna cortical’ donde proponía que la información en la corteza somatosensorial era procesada de forma vertical, por todas las capas, en unidades funcionales llamadas columnas (Mountcastle, 1957); Woolsey y Van der Loos hipotetizaron que la información en S1BF sería procesada de una forma muy topográfica, es decir, ‘una vibrisa-un barril’. Por tanto, cada barril recibiría la información de su correspondiente vibrisa del lado contralateral del animal (Woolsey y Van der Loos, 1970).

Desde su descubrimiento, la S1BF de roedores, como región específica dentro de S1, ha sido ampliamente estudiada. La anatomía de los barriles es relativamente simple: una agrupación de somas de neuronas excitadoras corticales de capa 4, en su mayoría SSCs, localmente conectadas, formando el barril, donde reciben aferencias TCs y CCs (Feldmeyer y cols., 1999). En ratones, el barril se compone de un centro, adonde se dirigen las dendritas de las SSCs, rodeado por una zona periférica con un mayor número de somas, aunque esto varía entre especies. Los barriles quedan separados por unas láminas de menor densidad celular que los individualiza llamadas septa, los cuales son menos prominentes en ratón que en rata (Welker y Woolsey, 1974; Krubitzer y cols.,

2011). En ratones, la columna cortical correspondiente a un barril contiene, distribuidas por todas las capas, alrededor de 6500 neuronas (Lefort y cols., 2009).

Tangencialmente, el patrón de disposición de los barriles replica el patrón de las vibrisas en la cara del animal. En el ratón y en la rata, los barriles más grandes están en la parte posteromedial de la S1BF, correspondientes a las macrovibrisas; y los barriles más pequeños se localizan en la parte anterolateral, correspondientes a las vibrisas más pequeñas. Se distribuyen en cinco filas que se nombran de la A a la E (Figura 8) (Fox, 2008). Las vibrisas son pelos especializados en la exploración del entorno, debido a la presencia de mecanorreceptores en sus folículos, los cuales son la entrada de la información somestésica. En ratón, la corteza de barriles representa aproximadamente el 13% de la superficie cortical total y un 69% de S1 (Fox, 2008; Bosman y cols., 2011; Vitali y Jabaudon, 2014).



**FIGURA 8: Esquema de la posición de las vibrisas en la nariz del ratón (izquierda) y su correlación con la posición tangencial de los barriles en S1BF (derecha).** Sólo se han representado los folículos de la fila C (C2 destacado en amarillo). Tomado de Petersen (2007)

El desarrollo de este mapa somatotópico cortical empieza entre el día embrionario 15 y 17 en ratón, y concluye aproximadamente en el día postnatal 7. Las células corticales se generan en la zona ventricular y subventricular, y migran por la glía radial formando la corteza. La organización somatotópica cortical se establece por un sistema de difusión

diferencial de moléculas atrayentes y repelentes que establecen un gradiente químico determinante para la distribución de las SSCs formando los barriles en la capa 4. La llegada de las aferencias talámicas y su distribución diferencial también contribuye a esta organización (López-Bendito y Molnar, 2003; Fox, 2008). El desarrollo correcto de la estructura, tan especializada, de la S1BF, es crucial para el procesamiento de la información sensorial procedente de las vibrisas. La probabilidad de respuesta de las neuronas de la S1BF por la llegada de información es específica de cada tipo celular y de cada capa cortical (Brecht y Sakmann, 2002; De Kock y cols., 2007). Diversos estudios han propuesto que la respuesta que se observa en las células de capa 4 evocada por un estímulo sensorial es debida, fundamentalmente, a la inhibición por antealimentación producida por los TCAs (Swadlow y cols., 2002; Gabernet y cols., 2005; Sun y cols., 2006; Cruikshank y cols., 2007).

Sin embargo, para entender el funcionamiento de la S1BF, debemos primero entender de qué regiones recibe la información sensorial y de qué manera llega dicha información para ser procesada; para, posteriormente, elaborar una respuesta adecuada.

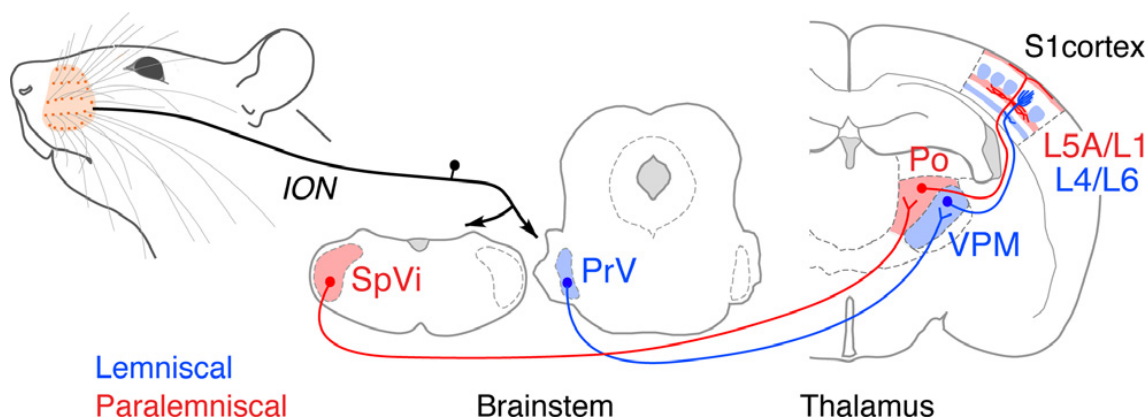
#### **4.1.Las Diversas Vías Trigémino-Tálamo-Corticales**

La información sensorial procedente de las vibrisas tiene dos relevos principales antes de alcanzar la corteza cerebral: el complejo trigeminal troncoencefálico y el tálamo. El complejo trigeminal sensitivo se compone del núcleo principal del trigémino (PrV), localizado anteriormente al núcleo espinal trigeminal (SpV), que comprende una región oral (SpVo), una interpolar (SpVi), y una caudal (SpVc). Fibras aferentes de la raíz trigeminal se bifurcan para formar una rama ascendente hacia el PrV y una descendente hacia el SpV (Hayashi, 1980). Todos estos núcleos, excepto el SpVo y la parte rostral del SpVi, contienen “barriletes”, grupos de neuronas que se organizan de forma similar a los barriles en corteza, y que por tanto, cada uno recibe información de su correspondiente vibrisa (Belford y Killackey, 1979; Li y cols., 1994; Erzurumlu y cols., 2010).

La siguiente estación de relevo para la información trigeminal es el tálamo. Los dos núcleos fundamentalmente involucrados en la transmisión del estímulo procedente de las vibrisas hacia S1 son: el VPM y el Po. Sin embargo, el procesamiento de la información en ambos núcleos, así como, sus proyecciones a la corteza cerebral son diferentes. El

VPM recibe sus aferencias manteniendo la organización somatotópica, ya que posee, de forma análoga a los barriles en corteza y a los barriletes en el PrV, “barriloides”, localizados en la parte dorsomedial del núcleo (VPMdm). Sin embargo, la parte ventrolateral (VPMvl) recibe información de varias vibrisas al igual que el Po (Land y cols., 1995; Pierret y cols., 2000; Haidarliu y Ahissar, 2001).

Por tanto, se han descrito diferentes vías trigémino-tálamo-corticales debido al diferente patrón de conexiones, encargadas del procesamiento de distinta información, pero complementaria. Una de estas es la **vía lemniscal**, que lleva la información de una sola vibrisa de los barriletes del núcleo PrV a los barriles de S1BF, vía barriloides de VPMdm (Veinante y Deschênes, 1999). Los TCAs procedentes del VPMdm proyectan hacia la capa 4 cortical, arborizando, de manera focal y muy densa, en los barriles, alcanzando la parte más profunda de la capa 3. También dejan algunas terminales en capas 5b y 6a (Figura 9) (Killackey, 1973; Koralek y cols., 1988; Chmielowska y cols., 1989; Lu y Lin, 1993; Bureau y cols., 2006; Petreanu y cols., 2009; Meyer y cols., 2010; Oberlaender y cols., 2012). Fisiológicamente, las NTCs localizadas en los barriloides de VPMdm responden con una alta precisión temporal y una latencia corta, al estímulo en la vibrisa correspondiente (Simons y Carvell, 1989; Diamond y cols., 1992; Brecht y Sakmann, 2002). Una segunda vía, cuyo relevo talámico es el VPMvl, es la llamada **vía extralemniscal**. Las neuronas que proyectan a dicha región se localizan entre barriletes, en la parte caudal del núcleo SpVi, por tanto, llevan información de varias vibrisas. Los TCAs procedentes del VPMvl proyectan a las capas 4 y 6 de la corteza somatosensorial secundaria (S2), así como a los septa de capa 4 de S1BF (Pierret y cols., 2000). La tercera vía, llamada **vía paralemniscal**, procede de las neuronas de la parte rostral del núcleo SpVi (Erzurumlu y Killackey, 1980; Williams y cols., 1994; Veinante y cols., 2000) que proyectan al núcleo Po talámico, cuyas NTCs alcanzan múltiples áreas corticales como S1BF, S1, S2 y M1; así como el estriado. Sus TCAs arborizan de forma extensa en las capas 5a y 1 de S1BF, así como en los septa de capa 4 (Figura 9). Sin embargo, este patrón de inervación laminar cambia en las diferentes regiones corticales (Koralek y cols., 1988; Chmielowska y cols., 1989; Lu y Lin, 1993; Bureau y cols., 2006; Petreanu y cols., 2009; Wimmer y cols., 2010; Ohno y cols., 2012).



**FIGURA 9: Representación esquemática de las vías lemniscal (azul) y paralemniscal (roja).** Tomada de Frangeul y cols. (2014)

Aparte de estas tres vías lemniscales principales, se sabe que existen al menos otras tres implicadas en el procesamiento de información procedente de múltiples vibrisas. La primera de ellas procedería de las neuronas del núcleo PrV localizadas entre barriletes que proyectan al Po, y a las “cabezas” de los barriloides de la región marginal del VPMdm (VPMh) (Veinante y Deschênes, 1999). Las NTCs localizadas en estas “cabezas” proyectan a los septa de S1BF (Furuta y cols., 2009). Otra vía de procesamiento de información somatosensorial de múltiples vibrisas es la correspondiente a la proyección desde el núcleo SpVi al núcleo laterodorsal talámico (LD), cuya proyección a S1BF es dispersa y poco abundante (Bezdudnaya y Keller, 2008). Por último, el núcleo SpVo proyecta a las regiones más caudales tanto del VPM como del Po (Veinante y cols., 2000), cuyas proyecciones son fundamentalmente hacia la corteza perirrinal, el estriado y la amígdala (Groenewegen y Witter, 2004).

#### **4.2. Los Axones Procedentes del VPMdm y Po como Elementos Presinápticos de la STC en la S1BF**

Como se ha descrito anteriormente, en roedores, las NTCs que transmiten información de las vibrisas a la S1BF formando parte de dos vías segregadas (lemniscal y paralemniscal), se localizan en los núcleos VPMdm y Po talámicos respectivamente (Figura 9) (revisado por Bosman y cols., 2011).

El VPMdm es una subdivisión del núcleo VPM localizado en la región ventral posterior talámica. El VPMdm es particularmente prominente debido a la organización celular en

grupos diferenciados (barriloides), conservando la organización somatotópica de las vibrisas. Diversos estudios electrofisiológicos han comprobado que las neuronas del VPMdm responden rápidamente y con precisión a la deflexión de las vibrisas (Simons y Carvell, 1989; Friedberg y cols., 1999; Brecht y Sakmann, 2002). Estas neuronas, a su vez, muestran unos índices de disparo muy altos que les permiten codificar la señal recibida con una alta precisión tanto espacial como temporal, y así, producir unos potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) de gran amplitud que permiten transmitir la información de forma fiable, es decir, con una alta probabilidad de alcanzar el umbral de disparo de las SSCs de capa 4 de la S1BF (Gil y cols., 1999; Brecht y Sakmann, 2002; Meyer y cols., 2010; Kuhlman y cols., 2014; Reyes-Puerta y cols., 2015). Sin embargo, se han observado diferencias en el procesamiento de la información sensorial procedente de las vibrisas en las diversas estaciones. En primer lugar, mientras que la información en el ganglio trigeminal es codificada con una alta precisión (Jones y cols., 2004; Arabzadeh y cols., 2005), en la S1BF se observa una marcada variabilidad a estímulos idénticos debida a interacciones intracorticales (Petersen y cols., 2003). En segundo lugar, los campos receptivos de las neuronas en ambas regiones son diferentes, siendo los de la corteza notablemente más amplios (Zhu y Connors, 1999; Brecht y cols., 2003). Estas observaciones sugieren una cierta función asociativa por parte de la corteza generando un contexto cortico-dependiente para la información procedente del VPMdm. Debido a estas características electrofisiológicas, a la organización topográfica de sus TCAs y a las aferencias que recibe de regiones subcorticales, se considera al VPMdm como un núcleo talámico de ‘primer orden’, es decir, representa el primer relevo hacia la corteza de un tipo específico de información subcortical (Sherman y Guillery, 2006; Guillery y Sherman, 2011; Rovó y cols., 2012).

Aunque la vía lemniscal es la vía principal de transmisión de la información mecanosensitiva relacionada con las vibrisas, como ya se ha descrito anteriormente, no es la única. La parte rostral del núcleo SpVi proyecta al núcleo Po talámico formando la vía paralemniscal (Yu y cols., 2006; Bosman y cols., 2011). El núcleo Po es en realidad un complejo nuclear que, tanto en carnívoros como en primates, se divide en una porción medial, una porción lateral y una intermedia. Sin embargo, en roedores, sólo aparece bien definida la porción medial (Jones, 2007). En ellos, el núcleo Po presenta dos partes: una parte anterior (Po propiamente dicho) que se extiende dorsal al núcleo VPM, lateral al núcleo central lateral y parafascicular, y ventral al complejo lateral posterior; y una parte

posterior o caudal, menos definida, que se extiende medial al complejo geniculado medial y queda limitada medialmente por el pretecho (Diamond, 1995; Franklin y Paxinos 2008). Desde las inyecciones de aminoácidos tritiados en el Po de la rata realizadas por Herkenham (1980) se ha confirmado que las proyecciones desde el núcleo Po arborizan en diversas áreas (como S1, S2 y M1) y además presentan un patrón de innervación laminar diferente en cada área, a diferencia de lo observado en las proyecciones desde el VPM. Además, recientemente en nuestro laboratorio, se ha descrito con detalle las proyecciones del núcleo Po del ratón confirmando la arquitectura multispecífica de sus axones en corteza y describiendo regiones específicas dentro del núcleo, donde las NTCs que proyectan a la capa 1 y 5a de la S1BF, se localizan en la región dorsolateral del Po (Porrero, 2016). En la capa 5a, establecerían contacto sináptico con neuronas piramidales, cuya dendrita apical asciende hasta la capa 1, formando un penacho simple o poco profuso, donde también serían innervadas por los axones procedentes de Po (Petreanu y cols., 2009; Meyer y cols., 2010; Oberlaender y cols., 2012). Además, las NTCs del núcleo Po responden con una baja resolución espacial con campos receptivos compuestos por múltiples vibrisas, y su latencia de respuesta es 3 veces mayor que la observada en VPMdm, lo que sugiere una intervención de parte de neuronas corticales (Diamond y cols., 1992; Ahissar y cols., 2000). Se ha demostrado que la principal aferencia que recibe el Po no proviene de regiones subcorticales, sino que procede de la capa 5b cortical (Theyel y cols., 2010; Viaene y cols., 2011). Además, recibe una potente aferencia inhibitoria desde la zona incerta (Barthó y cols., 2002; Trageser y Keller, 2004). Por tanto, se ha propuesto, que la vía paralemniscal esté encargada del procesamiento temporal del estímulo táctil, por lo que la proyección de Po a S1BF modularía la duración y la magnitud de la respuesta de S1 al estímulo sensorial recibido por parte del VPMdm (lemniscal) (Ahissar y cols., 2000; 2001; Yu y cols., 2006; Castejón y cols., 2016). Debido a estas características electrofisiológicas, al patrón de innervación de sus TCAs en diferentes áreas y a las aferencias corticales de tipo “driver” que recibe, se considera al Po como un núcleo talámico de ‘orden superior’, es decir, representa un relevo talámico en la comunicación entre áreas corticales (Sherman y Guillery, 2006; Guillery y Sherman, 2011; Rovó y cols., 2012).

Las diferencias, tanto anatómicas como electrofisiológicas, de ambos núcleos talámicos en el procesamiento de la información somatosensorial procedente de las vibrisas impulsó diversos estudios comparando ambos núcleos y sus conexiones para así poder arrojar luz



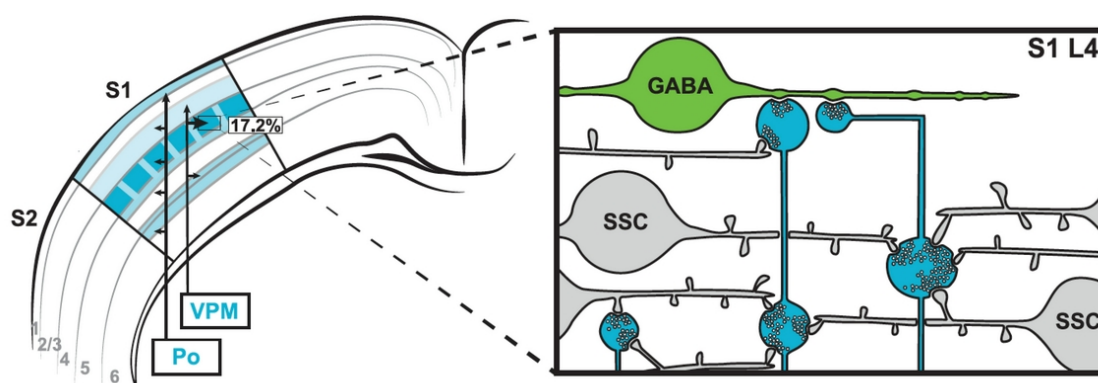
sobre cómo es procesada la información somatosensorial a través de un flujo de información paralelo por el conjunto de vías lemniscales. En un sentido anatómico, se destacan los estudios de Koralek (1988) que investigó por primera vez las diferencias en los patrones laminares de innervación cortical en S1 del Po frente a los de VPM, realizando inyecciones de aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa (WGA-HRP) en ambos núcleos y observó un patrón de innervación cortical, en cortes tangenciales, complementario: los axones del VPM arborizaban de forma densa en los barriles de capa 4, mientras que los del Po lo hacían en los septa, así como en otras regiones de S1 y en S2. Años más tarde, un estudio con trazadores anterógrados inyectados en ambos núcleos del tálamo de rata describió las proyecciones a capas 4 y 6 de S1BF por parte de VPM, y las proyecciones a capas 1 y 5 y a los septa de capa 4 por parte de Po (Lu y Lin, 1993). Estudios más recientes con vectores virales han comprobado que la zona más densamente innervada por los axones de VPM es la de los barriles de capa 4, y la más densamente innervada por Po es la capa 5a de S1BF (Meyer y cols., 2010; Wimmer y cols., 2010). En un sentido funcional, los estudios de Diamond (1992), partiendo de las diferencias electrofisiológicas encontradas entre ambos núcleos talámicos, propusieron que la información espacial sería vehiculada por la vía lemniscal a través del VPMdm, y la información temporal por la vía paralemniscal a través del Po. Estudios más recientes han apuntado que ambas vías vehicularían distintos aspectos relacionados con el tacto activo, estando el Po también relacionado con el control del movimiento de las vibrisas y con el control del procesamiento del estímulo sensorial en la S1BF (Yu y cols., 2015; Castejón y cols., 2016). Además, se ha descrito a microscopía óptica, los tamaños relativos al área de proyección máxima de los botones sinápticos procedentes de VPM y Po en distintas áreas y capas corticales, encontrando diferencias significativas entre ellos (Viaene y cols., 2011; Porrero, 2016).

Por tanto, dada las diferencias descritas entre las proyecciones TCs entre los núcleos VPMdm y Po talámicos, cabe pensar que a nivel ultraestructural, presenten también diferencias. Sin embargo, en este sentido, muy pocos estudios se han centrado en el estudio de los botones sinápticos de los TCAs correspondientes a estos núcleos, y en particular en los botones sinápticos de los axones de Po.

Los primeros estudios que abordaron el estudio de la STC en S1 se centraron en los barriles de la capa 4 de dicha área utilizando el método de degeneración anterógrada de



TCA's inducida por lesión electrolítica del complejo VP afectando también, en algunos casos, al núcleo Po (White y Hersch, 1982; White y cols., 1984; White, 1989; Benshalom y White, 1986). Estos axones en degeneración podían ser identificados ya que aparecían ‘marcados’ (White, 1978). Esta técnica, aún con sus limitaciones, permitió identificar como diana preferente de estos axones las espinas de las SSCs (Figura 10) (Benshalom y White, 1986). Sin embargo, desde la década de los 90 en adelante, estos estudios se empezaron a realizar con inyección de trazadores anterógrados (como PHA-L, WGA-HRP o BDA), los cuales permitían estudiar la ultraestructura de estos axones ‘intactos’ (Lu y Lin, 1993; Kharazia y Weinberg, 1994; Lev y cols., 2002; White y cols., 2004). Estos estudios observaron que los botones sinápticos TCs tenían un tamaño relativamente grande, con abundantes mitocondrias y vesículas sinápticas, y que frecuentemente establecían más de una sinapsis (el 25% de los botones eran multisinápticos) (Figura 10). Además, no observaron diferencias entre los botones sinápticos de los axones procedentes de VPM con los de Po (Lu y Lin, 1993). El estudio más reciente llevado a cabo por White y cols. (2004) mostraba, además, la reconstrucción de seis segmentos axónicos varicosos marcados por inyecciones de BDA en VPM, aportando así un nuevo dato relevante: que el 12% de las sinapsis establecidas por los TCAs se localizaban en zonas no varicosas, es decir, describió sinapsis fuera de botón. Sin embargo, ninguno de estos estudios realizaron una reconstrucción tridimensional detallada de todos los elementos de la STC, ni un análisis cuantitativo detallado del tamaño de los botones sinápticos ni de sus componentes, ni de los elementos postsinápticos con los que establecían contacto.



**FIGURA 10: Esquema de las proyecciones de VPM y Po a S1 (izquierda) y sus contactos sinápticos a nivel ultraestructural (derecha).** La proyección de VPM a los barriles de capa 4 constituye el 17,2% del total de sinapsis asimétricas. Además, los botones sinápticos talámicos suelen establecer más de un contacto sináptico sobre las SSCs y sobre neuronas GABAérgicas. Tomado de Bopp y cols. (2017)

Estudios más recientes que han abordado este tema realizando reconstrucciones seriadas tridimensionales y medidas detalladas de los tamaños de los elementos implicados en la sinapsis en S1BF, por un lado, no han identificado los axones procedentes de los núcleos talámicos (VPMdm y Po), por lo que las medidas obtenidas no podrían aplicarse específicamente a la STC ya que no pueden diferenciarla con total seguridad de la sinapsis CC (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016); o por otro lado, han marcado los botones sinápticos TCs masivamente con vGLUT2 impidiendo así la identificación de botones sinápticos procedentes de núcleos talámicos específicos (Kubota y cols., 2007; 2015; Bopp y cols., 2017).

Además, varios estudios realizados en otras áreas corticales (M1, V1, corteza prefrontal, etc.) han obtenido diferentes medidas de parámetros estructurales de los elementos de la STC a nivel de microscopía electrónica; incluso, comparando, a este nivel, la proyección de los TCAs de diferentes núcleos talámicos a una misma área cortical, por lo que se han observado también diferencias entre los botones sinápticos, y entre sus dianas postsinápticas (Anderson y cols., 2009; da Costa y Martin, 2009; 2011; Familtsev y cols., 2016; Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017).

Por tanto, es necesario abordar el estudio de la STC primeramente con axones bien identificados y, en segundo lugar, con reconstrucciones seriadas tridimensionales de su

ultraestructura, que permitan obtener medidas fiables de la morfología de los diferentes elementos que participan en ella. Con este marco experimental, es posible el análisis de la STC formada por TCAs procedentes de núcleos talámicos determinados, así como la comparación entre ellos, necesaria gracias a las diferencias observadas, a nivel de microscopía óptica, tanto en su patrón de arborización laminar, como en el tamaño de sus varicosidades; específicamente de los axones procedentes de los núcleos VPMdm y Po que proyectan a una misma región cortical (S1BF). Además, gracias al estudio detallado de la estructura de la STC de estos axones talámicos, podría establecerse una relación con la eficacia sináptica observada y con las diferencias funcionales que los identifican como núcleo específico de primer orden con aferencia cortical directriz (VPMdm) o núcleo multiespecífico de orden superior con aferencia moduladora (Po).



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



Como hemos visto, desde el punto de vista funcional, la STC se caracteriza por una alta eficacia sináptica, llevada a cabo por las NTPs a larga distancia, que conectan monosinápticamente con la corteza cerebral. Sin embargo, a día de hoy, se sabe que existe una gran diversidad en sus arquitecturas axónicas, así como en su patrón de innervación tangencial y laminar. Por tanto, sería necesario un análisis detallado y cuantitativo de la estructura de la STC, así como de los elementos que intervienen, explorando esta supuesta diversidad.

Los datos obtenidos hasta la fecha mediante marcado masivo de botones TCs con vGLUT2 (Kubota y cols., 2007; 2015; Bopp y cols., 2017), y estudios de marcado anterógrado con depósitos de trazadores en diversos núcleos talámicos (Lu y Lin, 1993; White y cols., 2004; Anderson y cols., 2009; da Costa y Martin 2009), han puesto de manifiesto posibles diferencias morfológicas entre la STC y la sinapsis local intracortical, así como entre la STC de distintos núcleos talámicos. Sin embargo, muy pocos estudios se han centrado en la comparación específica de la STC de diversos núcleos talámicos (Chomsung y cols., 2010; Familtsev y cols., 2016), y ninguno de ellos con axones bien identificados.

Gracias a estudios realizados a nivel de microscopía óptica, se han observado diferencias, sobre todo en el tamaño de botones, entre la proyección de distintos núcleos talámicos, incluso en una misma región cortical (Viaene y cols., 2011; Porrero, 2016). Por lo que cabría esperar encontrar diferencias en cuanto a la ultraestructura de los elementos pre- y postsináptico que forman la STC, lo que implicaría diferencias a nivel funcional. Por tanto, nos hemos planteado realizar un análisis cuantitativo detallado para caracterizar la ultraestructura de la STC, así como para determinar las posibles diferencias entre los axones “específicos” frente a los “multiespecíficos”.

Los TCAs procedentes de los núcleos VPMdm y Po talámicos a S1BF han sido ampliamente estudiados y caracterizados recientemente a nivel de microscopía óptica (Meyer y cols., 2010; Wimmer y cols., 2010; Viaene y cols., 2011; Ohno y cols., 2012; Porrero, 2016), convirtiendo este circuito en un modelo idóneo para llevar el análisis conectómico al siguiente nivel de estudio: la ultraestructura sináptica de dichos TCAs y de los elementos postsinápticos con los que establecen contacto, y por tanto, las posibles diferencias entre ellos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Realizar un análisis cuantitativo tridimensional de la ultraestructura de los axones presinápticos procedentes de los núcleos VPMdm y Po talámicos en S1BF.
2. Determinar los elementos postsinápticos con los que establecen contacto los axones de VPMdm en la capa 4 y los axones de Po en la capa 5a en la región de S1BF.
3. Explorar las diferencias de la sinapsis en cuanto a su morfología y distribución de las neuronas tálamo-corticales “específicas” (VPMdm) y “multiespecíficas” (Po).



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El modelo animal escogido para realizar nuestro estudio ha sido el ratón *Mus musculus* perteneciente a la cepa C57BLACK6 (C57BL/6), de los que se han utilizado un total de 20 ratones adultos de 60-65 días de edad, y con pesos comprendidos entre los 20 y los 27 gr. Estos animales fueron criados en jaulas de 20x30 cm provistas de pienso y agua *ad libitum* en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y se realizaron de acuerdo con las directrices europeas (Directiva 2010/63/UE) y españolas, estas últimas refundidas y actualizadas en el R.D. 53/2013, del 1 de febrero, para el uso de animales en investigación.

En los últimos años, el modelo animal más utilizado en estudios neuroanatómicos ha sido el ratón. Prueba de ello son los estudios de conectómica a gran escala (Allen Brain Map, Human Brain Project). Su fácil estabulación, reproducción y bajo coste hacen al ratón una especie animal fácilmente manipulable desde el punto de vista experimental, e incluso genético, ya que existen una enorme cantidad de líneas transgénicas. El estudio de conexiones con técnicas de trazado ha tenido una gran expansión en dicho modelo, generando resultados de gran utilidad que han formado la base anatómica del análisis de los circuitos cerebrales para estudios futuros. Por otra parte, para la descripción de la STC basada en un análisis a nivel ultraestructural utilizando TEM, como el que nos ocupa, es preferible el uso del ratón, debido al menor tamaño de su cerebro, lo que optimiza el funcionamiento de los trazadores, y simplifica el procesamiento histológico y el posterior análisis de los resultados.

## 2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN

Antes de la cirugía se realizó una inducción anestésica del animal mediante la inyección intraperitoneal de una solución salina de 0,075 mg/g de ketamina (Ketolar®, Parke – Davis) y 0,02 mg/g de xilacina (Rompun®, Bayer). Tras comprobar que los reflejos estaban abolidos se rasuró la cabeza y se colocó al animal en un aparato para cirugía estereotáxica encefálica adaptado para animales pequeños (Kopf®, David Kopf instruments, Tujunga, California). La cirugía se realizó bajo anestesia gaseosa compuesta por Isoflurano al 0,5-2% en oxígeno a un flujo constante de 0,5 l/min, administrada mediante un aparato de anestesia inhalatoria veterinaria adaptado a pequeños animales (RX Cisneros S.L. Electromedicina), a través de una máscara de fijación especial para ratones (Kopf®, David Kopf instruments, Tujunga, California). El isoflurano sobrante era conducido a un contenedor de carbono activo mediante una bomba de vacío (Fluovac system, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA). El uso de la anestesia inhalatoria es debido a que permite unas cirugías bajo condiciones más estables y un porcentaje muy alto de supervivencia de los animales.

Para mantener la temperatura del animal durante el procedimiento quirúrgico, se colocó una almohadilla de agua circulante a 37°C (T-Pump®, Gaymar Industries, Orchard Park, New Jersey, EEUU). También, se puso sobre los ojos vaselina líquida para proteger la córnea de la desecación.

Tras comprobar nuevamente que el animal estaba arrefléctico se aplicó sobre la piel de la cabeza una solución antiséptica de povidona iodada (Betadine®, Viatris, Burdeos, Francia) y, se abrió la piel de la cabeza sobre la línea media con un bisturí, y se rebatió la piel y la galea aponeurótica, exponiendo el cráneo. Tras comprobar que los puntos de referencia bregma y lambda se encontraban a la misma distancia vertical, se localizaron sobre las superficie del cráneo las coordenadas anteroposterior (tomando bregma como punto de referencia) y mediolateral (desde la línea media) de nuestra región de interés (Franklin y Paxinos, 2008), y se realizó una pequeña craneotomía utilizando una trepanadora (Dremel® modelo 225, Dremel Europe) para reducir el espesor del hueso y un bisturí para cortar y levantar la lámina ósea restante sin dañar las meninges.

Una vez finalizada la aplicación del trazador, se taponó la craneotomía con gelatina hemostática (Espongostan Film; Ferrosan A/S, Soeborg, Dinamarca) humedecida en suero salino y se suturó la piel con hilo de seda trenzada esteril 2/0 (Lorca-Marín, Murcia, España). Para recuperar al animal de la anestesia, se le dejó ventilando con oxígeno al 100% a un flujo de 1L/min durante unos 15 segundos y se le mantuvo sobre la manta térmica hasta que empezaba a moverse. Transcurrido el periodo de supervivencia necesario para conseguir un transporte óptimo del trazador por todo el árbol axónico, los animales fueron sacrificados con una dosis letal intraperitoneal de pentobarbital sódico (80mg/Kg). Tras comprobar que los reflejos ante estímulos dolorosos estaban abolidos se abrió la cavidad abdominal y se cortó el diafragma y la parrilla costal, dejando expuesto el corazón. A continuación se retiró el pericardio y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja hipodérmica de 25G con el borde romo acoplada a una bomba peristáltica (MasterFlex, Cole-Palmer®). Acto seguido se perfundió al animal con suero salino tamponado isotónico durante 1 minuto, para retirar completamente la sangre del sistema vascular y, a continuación, se perfundió con 100ml de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% y glutaraldehído al 0,1% en tampón fosfato (PB) 0,1M a pH 7,4. Finalizada la perfusión, se decapitó al animal y se extrajo el encéfalo para postfijarlo durante 1 hora por inmersión en una solución fijadora de PFA al 4% en PB 0,1M.

### 3. TÉCNICA DE TRAZADO POBLACIONAL ANTERÓGRADO

Para realizar los experimentos de trazado anterógrado poblacional escogimos como trazador el Dextrano Biotinilado (BDA) de 10 Kda (1000-lysine fixable, Molecular Probes, Eugene OR, USA) diluido al 2,5% en tampón fosfato 0,01M a pH 7,4. Este trazador se transporta fundamentalmente de forma anterógrada a través del axón, produciendo un buen relleno del mismo, así como de sus terminales, una vez aplicado mediante iontoforesis (Reiner y cols., 2000). Además, tiene la ventaja de poder ser amplificado y revelado sin la necesidad de utilizar anticuerpos, al contrario que el trazador anterógrado PHA-L, lo que es fundamental para acortar el tiempo de procesamiento del tejido a favor de la mejor preservación del mismo para su estudio a nivel ultraestructural por microscopía electrónica.

Nos propusimos realizar depósitos de tamaño mediano que abarcasen una porción específica de ambos núcleos tálamicos, pero quedando confinados dentro de sus límites. Para realizar los depósitos de BDA utilizamos pipetas de tubo capilar de borosilicato (FHC, Bowdoinham, ME, USA) con un diámetro externo de 0.75 mm y con un filamento de vidrio en su interior para facilitar el relleno con el trazador. Los tubos capilares habían sido estiradas previamente con un estirador vertical (Modelo 700c, David Kopf instruments, Tujunga, California) de forma que el diámetro de los primeros 5 mm de pipeta fuese inferior a 100  $\mu\text{m}$ , evitando así dañar en exceso la corteza cerebral durante su descenso en el tejido. El extremo de la pipeta se cortó bajo lupa utilizando un bisturí y ajustando el poro a un diámetro de 6-10  $\mu\text{m}$ . El tamaño del poro se comprobó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 que tenía acoplada una cámara digital (Nikon DMX1200), bajo un objetivo de 40x y utilizando las herramientas de medida del software AnalySIS® 3.1.

Tras rellenar la pipeta con el trazador (por capilaridad, desde el extremo opuesto a la punta y con la ayuda de una vibrisa de gato), ésta se acopló a la torre estereotáxica y se situó sobre la coordenada de interés (Franklin y Paxinos, 2008). Una vez retirada la duramadre (utilizando una aguja hipodérmica con el extremo doblado en forma de gancho), se introdujo la pipeta lentamente hasta la coordenada vertical seleccionada (Franklin y Paxinos, 2008). Dichas coordenadas correspondieron a la localización de los núcleos VPMdm y Po tálamicos (VPMdm: 1,6 mm caudal, 1,6 mm lateral, y 3 mm ventral a la posición bregma; Po: 1,8 mm caudal, 1,4 mm lateral, y 2,7 mm ventral a la posición bregma; Franklin y Paxinos, 2008).

El trazador se inyectó mediante iontoforesis, aplicando una corriente positiva entre 600-800 nA durante 30 minutos en ciclos de 1 seg on/off a través de electrodos conectados a una fuente de corriente continua (Midgard, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). La alternancia de ciclos con paso y sin paso de corriente era importante para evitar el colapso de la punta por la atracción de macromoléculas cargadas negativamente y también para minimizar el daño causado por la corriente en el tejido. Al finalizar la inyección, dejamos reposar la pipeta en el sitio durante 10 minutos, para evitar el reflujo del trazador. Pasado ese tiempo se extrajo lentamente y se comprobó con el microscopio que el diámetro de la

punta no se había alterado. Para asegurar un relleno óptimo de los axones se estimó un tiempo de supervivencia de 5 días.

#### 4. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Pasado el tiempo de supervivencia estimado (5 días) para asegurar un transporte óptimo del trazador, sacrificamos y perfundimos los animales tal y como se detalló anteriormente. Finalizada la postfijación de los cerebros, se retiraron el tronco del encéfalo y los bulbos olfatorios con una cuchilla y siguiendo el plano coronal. El bloque resultante fue cortado en el plano coronal de forma seriada a 50  $\mu\text{m}$  con un vibratomo (Leica VT 1200S, Leica Microsystems GmbH), recogándose las secciones en cajas multipocillo con PB 0,1M de forma ordenada y en 2 series alternas. A continuación las secciones fueron crioprotegidas en una solución de sacarosa al 30% en PB 0,1M durante un periodo aproximado de 12 horas, en agitación a 4°C. Tras comprobar que las secciones se habían hundido en la solución crioprotectora, se dispusieron en una balsa de papel de aluminio para ser congeladas con nitrógeno líquido por aproximación de la balsa al líquido tres veces consecutivas, esperando a su descongelación cada vez antes de volverlas a aproximar. Este proceso de congelación-descongelación del tejido es fundamental para la aparición de microrroturas en el tejido para el posterior revelado del trazador sin comprometer la ultraestructura del tejido.

Posteriormente se procesaron ambas series de tejido con el fin de revelar el trazador. Para ello, en la primera serie de secciones, primero se inactivó la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10% en PB 0,1M durante 10 minutos y después se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (o durante una noche a 4°C) con el complejo avidina-biotina (ABC Elite®, Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1:100 en PB 0,1M. Tras la incubación con ABC y varios lavados del tejido en PB 0,1M, se realizó el revelado de la peroxidasa con DAB (3,3- diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico, Sigma, Saint Louis, MO; 0,02%) intensificado con sulfato amónico de níquel (1,2% níquel sulfato, 0,02% cloruro amónico). Para evitar los depósitos inespecíficos de DAB en el tejido se realizó una liberación muy controlada de peróxido de hidrógeno durante el proceso de revelado utilizando la reacción de la glucosa oxidasa (D-glucosa 0,2%, 0,003% glucosa oxidasa)

(Shu y cols., 1988). La reacción de revelado se realizó en tampón acetato sódico, en flotación y agitación.

Después del revelado, se comprobó la localización de la inyección y la calidad del trazado bajo el microscopio. De aquellos casos válidos, las secciones fueron montadas de forma ordenada sobre portaobjetos (Menzel-Glaser®, Menzel GmbH & Co KG) gelatinizados, utilizando tampón fosfato 0,03M. Tras dejar secar al aire durante una noche, las secciones fueron contrateñidas con tionina diluida 1:10 y deshidratadas en una serie ascendente de etanol (70°-80°-90°-100°) y, por último, sumergidas en xileno durante 30 minutos. Las preparaciones fueron cubiertas con cubreobjetos con DePex como medio de montaje. Estas secciones fueron utilizadas para realizar una delimitación citoarquitectónica general con microscopio óptico, así como la localización precisa de las inyecciones del trazador en el tálamo y los axones anterógradamente marcados en la corteza cerebral.

El revelado del trazador en la segunda serie de secciones fue similar, excepto por la omisión de la inactivación de la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  ya que este paso dañaría la ultraestructura; y por la ausencia de sulfato amónico de níquel para la intensificación del revelado con DAB, ya que dificultaría el análisis de los elementos subcelulares bajo microscopía electrónica de transmisión.

#### **4.1. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica**

En los experimentos de trazado anterógrado que produjeron un marcaje óptimo en la región de corteza de barriles dentro del área somatosensorial primaria, las secciones reveladas de la segunda serie (véase apartado anterior) que contenían la región cortical de interés con el marcaje más denso, fueron incubadas durante 45 minutos, en oscuridad y en viales de vidrio, con tetróxido de osmio al 1% en PB 0,1M. Posteriormente se retiró el tetróxido de osmio y se realizaron cuatro lavados consecutivos con PB 0,1M para retirar completamente el tetróxido de osmio. A continuación, se retiró el PB 0,1M y se incubaron las secciones con etanol de 50° durante 10 minutos y posteriormente se incubaron durante 40 minutos y en oscuridad, con acetato de uranilo al 1% diluido en etanol de 70°. Transcurrido el tiempo de incubación, las secciones fueron completamente deshidratadas en una serie ascendente de etanol (70°-80°-90°-100°; 10 minutos en cada uno). Las secciones, ya deshidratadas, se traspasaron de los viales de vidrio a unas pequeñas balsas

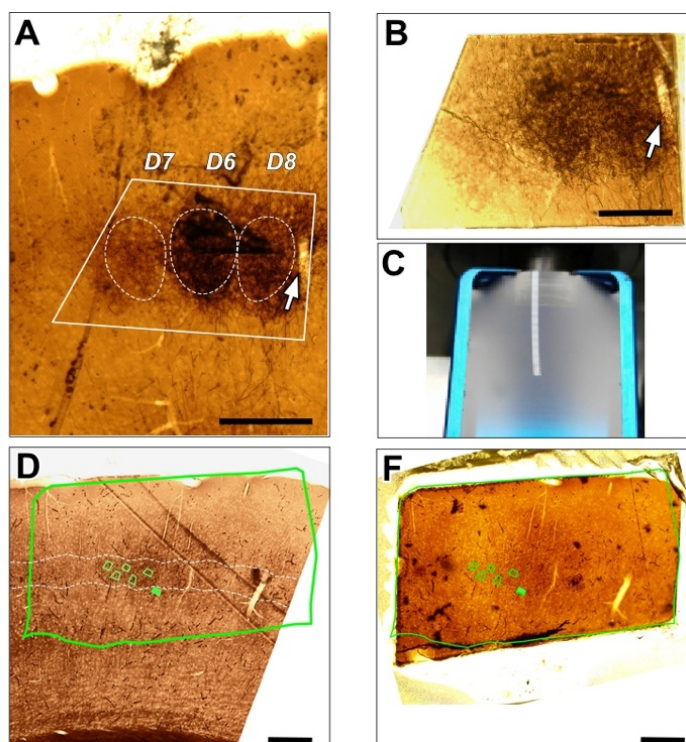


de papel de aluminio donde se realizaron dos lavados de 7 minutos con acetonitrilo. Posteriormente, se retiró el acetonitrilo y se incluyeron las secciones en una resina epoxy (Durcupan®, Electron Microscopy Science, Hartfield PA, USA) líquida previamente preparada (10 g de compuesto A + 10 g de compuesto B + 0,3 g de compuesto C + 0,3 g de compuesto D) y desgasificada. Pasada 1 hora para asegurar la total evaporación del acetonitrilo, se cubrieron las balsas con papel de aluminio y se dejaron las secciones en la resina líquida pura durante 12 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones embebidas en resina Durcupan® fueron traspasadas a un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos previamente tratado con LRA (Liquid Realease Agent, Electron Microscopy Science, Hartfield PA, USA). Se eliminaron las burbujas de aire del portaobjetos y las secciones se dejaron incubar en una estufa a 60°C durante 48 horas para la correcta polimerización de la resina epoxy. Finalizada la polimerización de la resina a 60°C, se retiró con una cuchilla el cubreobjetos.

#### **4.2. Técnica de corte seriado ultrafino y contratinción de secciones ultrafinas para su visualización en TEM**

Se observaron, con ayuda de una lupa, las secciones coronales incluidas en la resina Durcupan® y se seleccionó en cada una de ellas un fragmento de tejido que contuviese los axones revelados con DAB dentro de nuestra región de interés (capa 4 de la corteza de barriles de S1 que contenía axones marcados por la inyección en VPMdm (Figura 11A); y capa 5a de la corteza de barriles de S1 con axones marcados por la inyección en POm). Cada porción de tejido fue cortada con un bisturí y pegada sobre un bloque de resina polimerizada con pegamento de contacto.

Los bloques fueron tallados con cuchilla de vidrio mediante un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems GmbH) hasta conseguir un trapecio rectángulo que incluyera únicamente la región de interés (Figura 11B). A continuación, el tejido fue cortado con una cuchilla de diamante (Diatome) en el ultramicrotomo obteniéndose una serie continua de secciones ultrafinas ( $\approx$  70-100 secciones/serie;  $\approx$  60 nm de grosor) (Figura 11C). Estos cortes ultrafinos seriados fueron recogidos en rejillas de cobre de hendidura única (2 mm de largo x 1 mm de ancho; Electron Microscopy Sciences, Hartfield PA, USA) previamente forradas con pioloformo al 1% (1g de resina Formvar®



54

### 4.3.Preparación adicional de muestras para su visualización en FIB/SEM

Se seleccionaron bloques de Durcupan® con tejido procedente de los mismos experimentos para ser analizado con FIB/SEM (Figura 11D-F). Estos bloques se pegaron en cilindros de aluminio con adhesivos conductores de carbono. Para evitar artefactos por acumulación de carga, se cubrieron los lados y la base del bloque con pintura de plata. La superficie del bloque donde se localiza la muestra de tejido se cubrió con paladio y oro. Se obtuvieron muestras tridimensionales de tejido por un microfresado de la muestra a través de un haz de iones galio combinado con un microscopio electrónico de barrido (FIB/SEM). Para ello se utilizó un microscopio Crossbeam 540 equipado con un haz de iones galio y una columna SEM de alta resolución (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania).

## 5. IDENTIFICACIÓN DE PERFILES

El reconocimiento de los elementos celulares en las imágenes de microscopía electrónica se basó en las descripciones de Peters (Peters y cols., 1991). Los axones se caracterizan por presentar un contorno liso y suelen conservar un diámetro constante. Estos presentan abultamientos denominados varicosidades axónicas. Estas varicosidades pueden presentar mitocondrias de tamaño variable y vesículas en su interior y generalmente establecer contacto sináptico con otro perfil; por tanto, se denominan también en estos casos botones sinápticos, los cuales pueden estar separados entre ellos por segmentos axonales de menor calibre denominados segmentos intervaricosos o segmentos interbotón. A estas varicosidades se les denomina por tanto botones de paso o *en passant*. Los axones pueden terminar en un ensanchamiento varicoso de mayor diámetro denominado botón terminal o *terminaux*. En nuestro estudio, los TCAs procedentes de los núcleos VPMdm y Po tálamicos fueron fácilmente identificables gracias al producto de reacción opaco del revelado con DAB del dextrano biotinilado.

Las dendritas fueron identificadas por su contorno irregular, así como su contenido homogéneo de microtúbulos y la presencia de mitocondrias. Además no presentan en su interior vesículas sinápticas. Estas dendritas pueden presentar especializaciones de

membrana que consisten en una protuberancia dendrítica llamada espina compuesta por un contorno de pequeño calibre que termina en un ensanchamiento ovalado, denominados cuello y cabeza de la espina respectivamente. Estos perfiles suelen contener en su interior una especialización de retículo endoplásmico empaquetado llamado aparato de la espina; además las espinas no contienen mitocondrias. Las espinas dendríticas son características de varias estirpes neuronales corticales como las SSCs localizadas en la capa 4 cortical, así como de las neuronas piramidales corticales. En nuestro estudio, los botones sinápticos TCs establecen contactos sinápticos tanto con dendritas como con espinas dendríticas.

Los contactos sinápticos o sinapsis son lugares especializados y morfológicamente distinguibles donde se transmiten las señales neuronales de una célula (elemento presináptico) a otra (elemento postsináptico). Las sinapsis se pueden clasificar en eléctricas, donde las membranas de ambos elementos establecen un contacto tipo nexo; y químicas, donde las membranas de ambos elementos están separadas por una hendidura sináptica. En las sinapsis químicas el elemento presináptico generalmente es un axón que presenta una dilatación (botón sináptico), el cual contiene vesículas sinápticas las cuales acumulan y liberan el neurotransmisor a la hendidura sináptica. Las vesículas se clasifican en vesículas de centro claro donde sólo se aprecia la membrana, y vesículas de centro denso que contienen un gránulo denso central. Presentan un diámetro variable (40-50 nm). El neurotransmisor liberado difunde por la hendidura sináptica (10-30 nm) provocando un cambio eléctrico en el elemento postsináptico a través de la unión a su receptor.

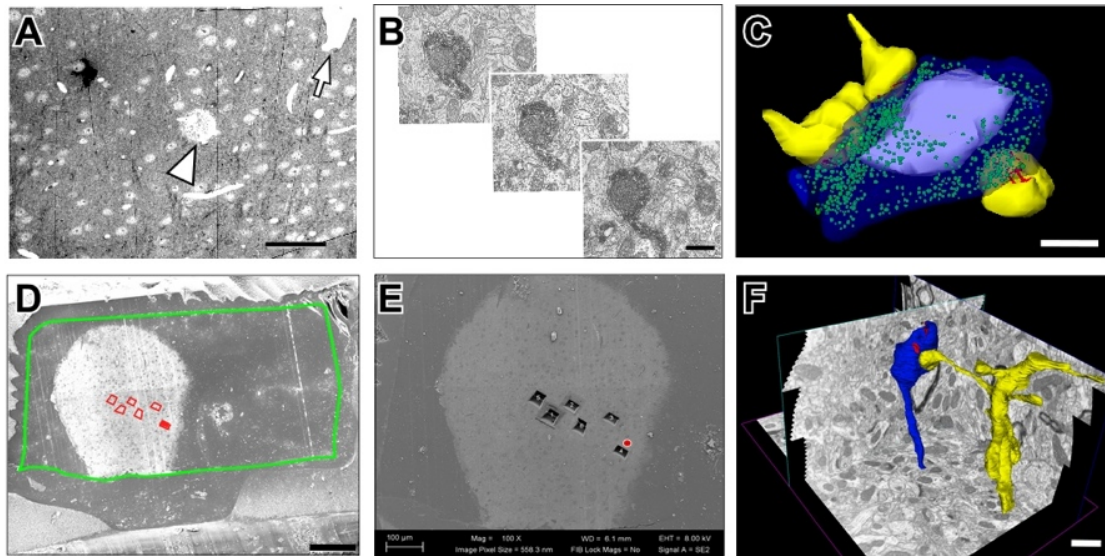
Las sinapsis químicas se clasifican atendiendo a las características estructurales de las especializaciones sinápticas en los elementos pre- y postsináptico denominadas densidades pre- y postsináptica. Dicha clasificación se basa en la descripción hecha por Gray en 1959. Se pueden observar entonces sinapsis asimétricas, que presentan un engrosamiento de la densidad postsináptica; y sinapsis simétricas que presentan densidades pre- y postsinaptica de tamaño similar. Las sinapsis asimétricas se denominan de tipo I o excitadoras y las asimétricas se denominan de tipo II o inhibitoras. En nuestro estudio, todas las STCs son de tipo asimétrica ya que el neurotransmisor implicado, el glutamato, es excitador. Además, debido al revelado axonal con DAB, sólo podremos analizar la PSD.

## 6. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE PERFILES

A nivel de TEM, se eligieron cortes al azar dentro de las series de rejillas y se buscaron perfiles marcados con BDA dentro de la región de interés. Los axones marcados visualizados fueron seguidos a lo largo de la serie de cortes ultrafinos a 4000x. Una vez identificado un botón sináptico, se tomaron fotografías digitales seriadas de toda su extensión (20-50 por botón) a 8000x usando el programa de adquisición de imágenes asociado al microscopio (Multi Images Acquisition Software, SIS, Olympus, Hamburg). Únicamente los botones ‘completos’ fueron incluidos en nuestro estudio, es decir, aquellos donde el botón sináptico pudo ser seguido de principio a fin en secciones consecutivas (Figura 12A-B).

Todas las series de fotografías que incluían al menos un botón sináptico completo fueron posteriormente analizadas con el programa de reconstrucción digital tridimensional OpenCAR (Contour Alignment Reconstruction; Sätzler y cols., 2002). Las imágenes digitales fueron alineadas creando un bloque de imágenes donde todas las estructuras de interés estaban bien definidas. Posteriormente, los perfiles de interés fueron delineados con la herramienta ‘contorno’, creando así, tras la unión seriada de todos los contornos, reconstrucciones volumétricas tridimensionales de las cuales se obtuvieron medidas de superficie y volumen (Figura 12C). En nuestro estudio, las estructuras incluidas fueron: el botón sináptico, las mitocondrias y vesículas sinápticas dentro del mismo, la PSD, y los perfiles postsinápticos que establecían contacto con el botón presináptico marcado. El número de vesículas fue reconstruido y estimado en los botones sinápticos TCS en los que el producto opaco del revelado con DAB fue lo suficientemente claro para definir aproximadamente el 95% de las vesículas contenidas dentro del botón. Se aplicó el método estereológico del Disector Físico para evitar la sobreestimación en secciones contiguas. El conteo de vesículas se realizó en un tercio de las secciones con un error máximo del 5%. El tamaño de la PSD fue estimado, por un lado, usando una línea de contorno que incluía toda la estructura electrón-densa localizada en el perfil postsináptico enfrentada a la hendidura sináptica para obtener el área total de la PSD; por otro lado, se estimó también el área de la interfaz de la PSD obtenida por la longitud de la aposición de la PSD en cada sección y multiplicada por el grosor y el número de secciones en las

que aparece. Ambos parámetros fueron estimados debido a que aparecen en la literatura indistintamente para la obtención del área de la PSD.



**Figura 12. Adquisición de microfotografías con TEM y FIB/SEM para la realización de reconstrucciones tridimensionales.** **A:** Microfotografía electrónica de una sección ultrafina realizada a 800x. Como referencia se indica con una flecha el vaso sanguíneo indicado en la figura 11A-B. El área muestreada (cabeza de flecha) es la región ilustrada en B. **B:** Tres microfotografías alineadas procedentes de secciones ultrafinas consecutivas donde se muestra un botón sináptico marcado. **C:** Reconstrucción 3D realizada en OpenCAR mediante microfotografías seriadas obtenidas con TEM. Se muestra un botón sináptico (azul) con una mitocondria (morado) y vesículas en su interior (verde) y 3 espinas (amarillo) estableciendo contacto. **D:** Fotografía electrónica obtenida con SEM de la superficie del bloque que contiene una muestra de S1BF (contorno verde). Las trincheras realizadas con FIB/SEM están delimitadas en rojo. **E:** Fotografía electrónica que contiene las trincheras realizadas con FIB que permiten la obtención del bloque seriado de imágenes con SEM. La trinchera indicada con un punto rojo fue descartada del análisis por no encontrarse en la capa 4 de S1BF. **F:** Reconstrucción 3D realizada con ESPINA de un segmento axónico marcado con un botón sináptico terminal (azul), el cual establece contacto sináptico con una espina reconstruida hasta su origen en un segmento dendrítico (amarillo). Se visualiza el bloque de tejido en los tres ejes del espacio obtenido con FIB/SEM. Escalas: A = 5  $\mu\text{m}$ ; B, J = 0,5  $\mu\text{m}$ ; C = 0,25  $\mu\text{m}$ ; D = 250  $\mu\text{m}$ ; E = 100  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de identificar con precisión las regiones de interés con el FIB/SEM, se adquirió una imagen electrónica secundaria a partir de la superficie del bloque que se superpuso y se comparó con las imágenes de microscopía óptica obtenidas previamente (Figura 12D). Una vez elegida la ubicación apropiada, se pulió una trinchera gruesa utilizando un haz de iones de galio de 7 nA para permitir la visualización del tejido cerebral bajo la superficie del bloque (Figura 12E). La superficie de la muestra fue explorada previo a la



obtención de una primera imagen utilizando un detector de electrones retrodispersado (voltaje de aceleración de 1,7 a 1,8 kV). Posteriormente, se alternaron ciclos de microfresado automatizado de la muestra y obtención de microfotografías de apariencia de TEM, obteniéndose finalmente un bloque de imágenes seriadas que permitió el posterior análisis y reconstrucción 3D (Figura 12F). Se realizaron ciclos de microfresado con el haz de iones galio ajustado a 700 pA para pulir un espesor de 25 nm por ciclo. La obtención de imágenes se realizó con el detector de electrones dispersados a una resolución de 5 nm por pixel, de manera que el tamaño del voxel del bloque de imágenes resultante fue de 5x5x25 nm. Se obtuvieron nueve bloques de imágenes con una resolución de 2048x1536 pixeles (campo de visión de 10,24x7,68  $\mu\text{m}$ ). El número de imágenes por serie varió en el rango de 149 a 337. El número total de secciones obtenidas fue de 2050, lo que corresponde a un volumen total de 4030,46  $\mu\text{m}^3$  analizadas. Para alinear las imágenes seriadas se utilizó el programa FIJI (Schindelin y cols., 2012), utilizando un modelo rígido para evitar la deformación de las imágenes individualmente. Los mismos elementos analizados con TEM fueron también reconstruidos tridimensionalmente en la serie de imágenes obtenidas a lo largo del bloque adquirido con FIB/SEM. Dichos elementos fueron medidos y reconstruidos con el programa ESPINA (Interactive Neuron Analyzer software v.2.1.10, desarrollado en el proyecto Cajal Blue Brain por la Universidad Politécnica de Madrid; programa de libre acceso en <http://cajalbbp.cesvima.upm.es/espina/>) (Figura 12F). Las reconstrucciones tridimensionales generadas de los sucesivos bloques de tejido fueron digitalmente unidas usando el programa de modelización 3D Unity (Unity Technologies, San Francisco, CA, USA).

En ninguno de los parámetros medidos en este estudio se ha realizado corrección por encogimiento del tejido debido a su procesamiento (fijación con aldehidos y deshidratación). Comparando los procesamientos de fijación con aldehido frente a criofijación del tejido, un estudio reciente en la corteza cerebral del ratón ha descrito una marcada diferencia en el volumen del espacio extracelular y en las células gliales pero no ha observado diferencias en el tamaño de los axones y las dendritas (Korogod y cols., 2015). Además, otros estudios han mostrado que no hay diferencias significativas en los valores de parámetros estructurales correspondientes a la sinapsis de muestras preparadas por congelación a alta presión o criosustitución frente a muestras preparadas con un procesamiento convencional de inclusión de tejido en resina, como el usado en el presente trabajo (Zhao y cols., 2012a; 2012b).

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis ultraestructural cuantitativo de los TCAs marcados, se clasificó cada perfil en botón TC, mitocondria, vesículas sinápticas, PSD, espina dendrítica y tallo dendrítico. Del botón TC, mitocondria, PSD y espina dendrítica se midieron el área y el volumen. Asimismo, se contó el número total de vesículas sinápticas. Las medidas de superficie y volumen de la espina dendrítica se obtuvieron únicamente de la zona identificada como cabeza de la espina. Con los datos cuantitativos del tamaño de dichos perfiles, se calculó la media, la desviación estándar (SD), la mediana, el rango de variación y el coeficiente de variación (CV), para cada grupo de datos.

Para determinar la correlación existente entre distintos grupos de parámetros se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Para determinar las diferencias entre las distribuciones del área de la densidad postsináptica de espinas y tallos dendríticos; y las diferencias entre las distribuciones del volumen del botón presináptico de los axones de las neuronas de proyección talámicas de los núcleos analizados, se utilizó la prueba no paramétrica de Kolmogórov-Smirnov (prueba K-S), realizando una comprobación previa de la normalidad con el test Saphiro-Wilk. Para determinar las diferencias entre las medias de distintos parámetros analizados pertenecientes al análisis de la STC de los núcleos VPMdm y Po talámicos, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (prueba M-W).



## IV. RESULTADOS

---



Hemos examinado la STC a nivel ultraestructural de los axones de las NTCs ubicadas en los núcleos VPMdm y Po talámicos del ratón. Para ello hemos realizado experimentos de trazado anterógrado de poblaciones neuronales restringidas.

Comenzaremos describiendo, a nivel de microscopía óptica, la distribución de los axones procedentes de los núcleos talámicos VPMdm y Po en S1, concretamente en S1BF, correspondiente a la información procedente del sistema de vibrisas del ratón, obtenida tras realizar depósitos de BDA en dichos núcleos. A continuación analizaremos, a nivel de microscopía electrónica, la STC entre los axones talámicos marcados con el trazador y las neuronas corticales, concretamente en las capas 4 y 5a de la corteza de barriles. Por último, realizaremos reconstrucciones tridimensionales de botones sinápticos marcados así como de los diferentes elementos subcelulares implicados en la sinapsis y de los perfiles postsinápticos a dichos botones. Además, estas reconstrucciones nos permitirán analizar cuantitativamente los diferentes elementos implicados en la sinapsis.

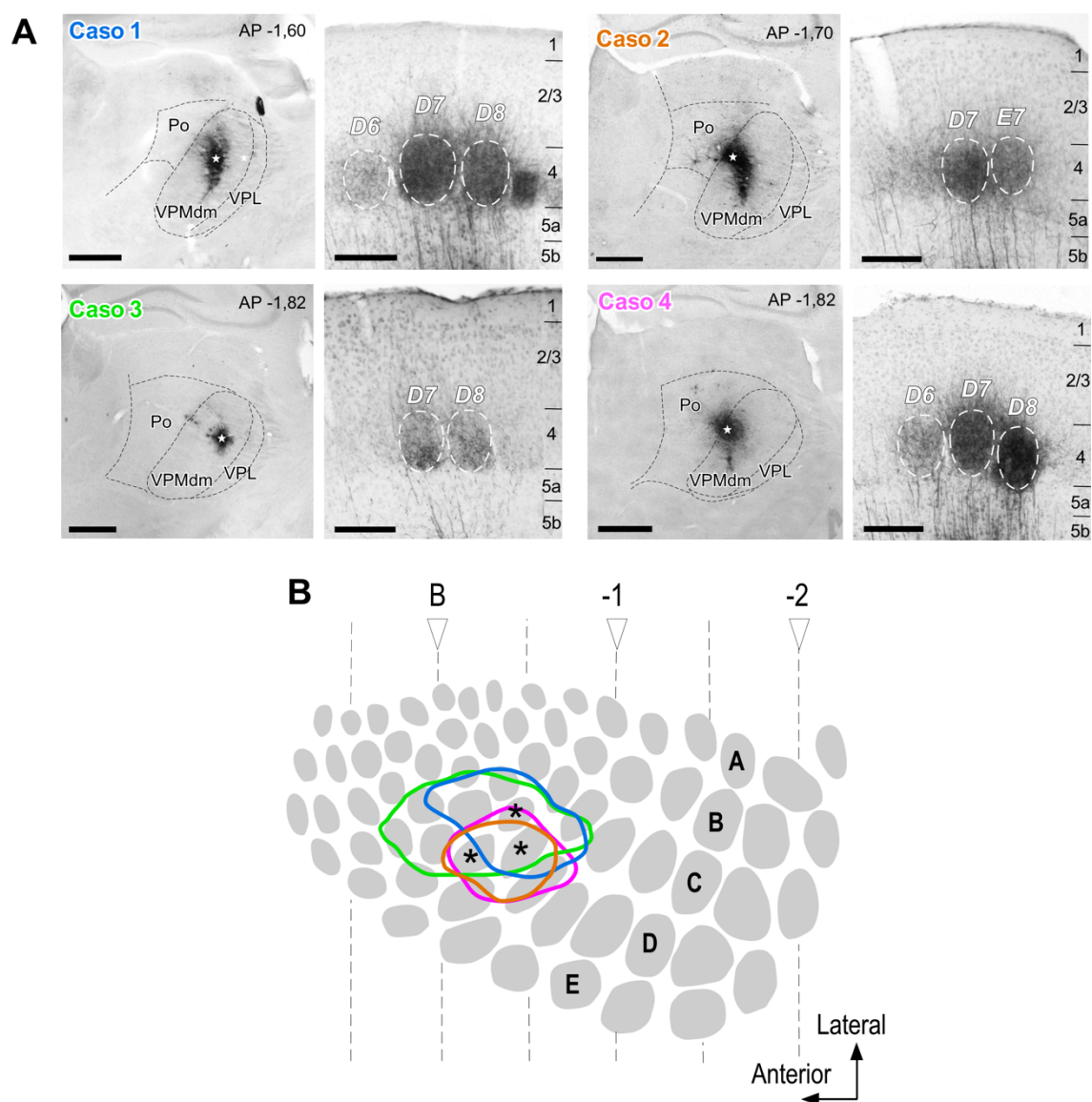
## 1. VISUALIZACIÓN A MICROSCOPIA ÓPTICA DE LOS AXONES MARCADOS CON BDA

### 1.1. Experimentos de trazado anterógrado con depósitos de BDA en VPMdm

En cuatro casos (Caso 1-4) de los 6 que mostraron inyección en VPM, el depósito de BDA estuvo restringido a la parte dorsomedial del núcleo VPM talámico (alguno de ellos con una mínima contaminación en el núcleo Po adyacente). Además, las cuatro inyecciones seleccionadas para su posterior análisis en microscopía electrónica, abarcaron la porción medial de la región de los “barrelloides” en VPMdm. Esta región contiene a las NTPs que llevan información de las macrovibrisas anteriores a la capa 4 cortical de la región S1BF de una manera muy topográfica (Figura 13A) (Land y cols., 1995). En estos experimentos se observaron de 4 a 6 focos con una alta densidad de axones marcados. Se localizó la distribución de estos axones en un mapa plano que representaba la región cortical de S1BF realizado a partir de secciones coronales seriadas del atlas de Franklin y Paxinos (2008), y complementado con la imagen de un hemisferio aplanado teñido con citocromo oxidasa de ratón adulto tomado de .....; lo que mostró

una alta densidad de axones marcados en los “barriles” D7-8/E7 fundamentalmente (Figura 13B).

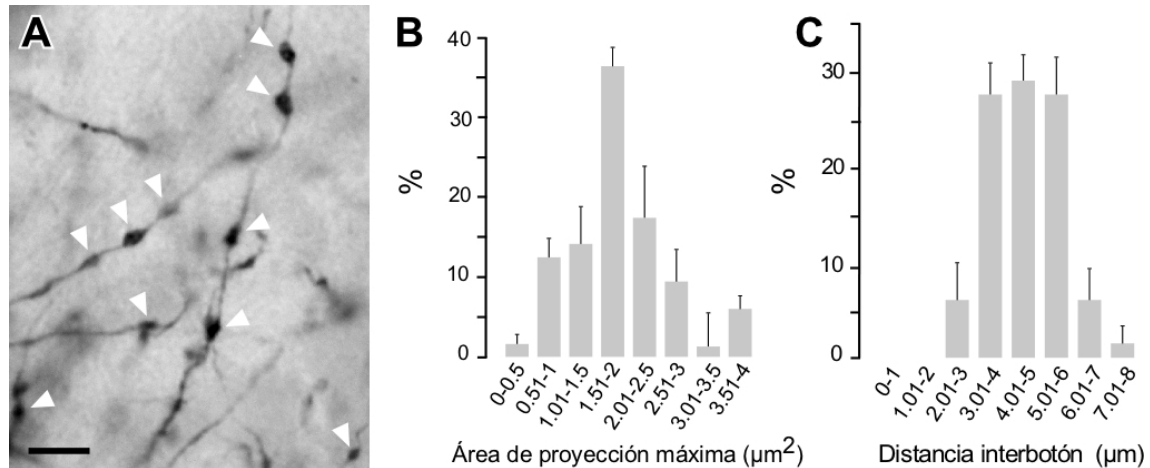
En la región de S1BF se observó un plexo muy denso de axones marcados, los cuales delinearon específicamente los barriles localizados en la capa 4. También se pudieron observar algunos axones que ascienden y se extienden por la región profunda de la capa 3 cortical, sin embargo no se visualizaron axones marcados en la capa 1 (Figura 13A). En la capa 6a se observó un plexo difuso de axones marcados, justamente en la región que se encuentra debajo de los barriles de capa 4 que contenían la mayor densidad de marcado. Por último, la capa 5 contenía axones marcados que ascendían hacia la capa 4 sin ramificarse. Se encontraron algunas neuronas piramidales marcadas de forma aislada en la capa 6 debido a un transporte retrógrado del BDA desde los terminales axónicos de dichas neuronas que se encuentran en la zona de inyección donde se realizó la electroporación del trazador en el VPMdm. Este marcado neuronal se consideró como contaminación, ya que sólo se ha considerado el marcado anterógrado de los terminales axónicos en la corteza. Se observaron somas, árbol dendrítico y segmento inicial del axón marcados, sin embargo, no se observaron colaterales axónicas marcadas, las cuales ascienden hasta los barriles de capa 4 (Feldmeyer, 2012).



**FIGURA 13. Experimentos de trazado anterógrado poblacional mediante depósitos de BDA en VPMdm. A:** Localización de los depósitos en el núcleo VPMdm (Caso 1-4) y de los axones marcados en la región de S1BF. AP indica la distancia (en mm) en el eje anteroposterior respecto a Bregma. La estrella blanca indica el centro de la inyección. **B:** Representación sobre el mapa plano de la región S1BF del ratón del marcado cortical obtenido en capa 4 en cada experimento. Los asteriscos marcan los barriles con marcado axonal coincidente en los 4 casos (D7-8/E7). Los valores en la parte superior del mapa indican la distancia respecto a B (Bregma) en mm. Escala = 250  $\mu$ m.

Un análisis con el objetivo de 100x bajo el microscopio óptico de los axones marcados en capa 4 reveló que los axones presentaban una alta densidad de varicosidades (botones sinápticos putativos) separadas entre sí por segmentos axónicos más finos (segmentos interbotón), dando un aspecto arrosariado a estos axones (Figura 14A). Las varicosidades eran de tamaño variable por lo que se dibujaron a cámara clara una población de 100 varicosidades de cada uno de los cuatro casos (N = 400) y se redibujaron con el programa

CANVAS obtuviéndose un área de proyección máxima desde  $0,4 \mu\text{m}^2$  a  $3,7 \mu\text{m}^2$  (media  $1,83 \pm 0,75 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 14B), así como unos segmentos inter-botón desde  $2,4$  a  $7,3 \mu\text{m}$  (media  $4,60 \pm 1,16 \mu\text{m}$ ) (Figura 14C).



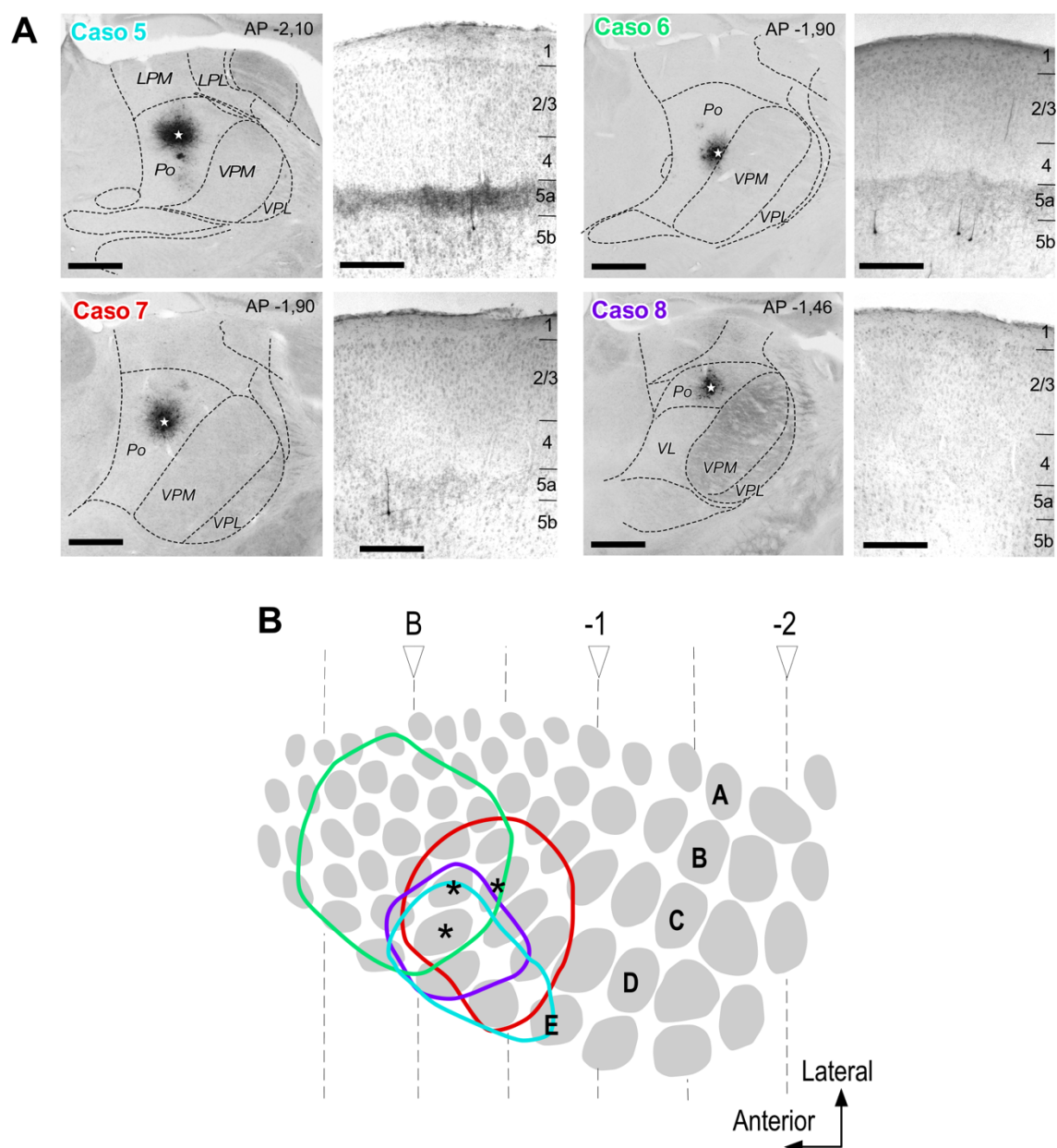
**FIGURA 14. Visualización y análisis de los axones a 100x en el centro del barril. A:** Visualización a 100x de los axones marcados y sus varicosidades de varios tamaños (cabezas de flecha). **B:** Distribución de áreas de proyección máxima de las varicosidades de los axones marcados medidas al microscopio óptico (100x). **C:** Distribución de longitudes de segmentos inter-botón de los axones marcados medidos al microscopio óptico (100x). Escala = 5  $\mu\text{m}$ .

## 1.2.Experimentos de trazado anterógrado con depósitos de BDA en Po

En cuatro casos (Caso 5-8) de los 6 que mostraron inyección en Po, el depósito de BDA estuvo restringido a la región del núcleo Po talámico que proyecta a S1BF (alguno de ellos con una mínima contaminación en el núcleo VPM o en el núcleo ventral lateral (VL) adyacentes). Las inyecciones seleccionadas para el análisis con microscopía electrónica se localizaron en la porción anterior y dorsolateral del núcleo (Figura 15A). Gracias a datos previos obtenidos en nuestro laboratorio, se ha comprobado que dicha zona del núcleo Po proyecta a S1 así como, preferentemente a cortezas motoras. A su vez, dentro de S1BF, proyecta a los barriles más mediales y anteriores. Por tanto, las inyecciones realizadas en Po proyectan a la región de los barriles incluidos en las inyecciones en VPMdm (ver apartado 1.1). Las neuronas de proyección talámicas procedentes del núcleo Po arborizan en las capas 5a y 1 corticales dentro de S1BF, con una mayor densidad en la capa 5a, llevando información trigeminal procedente de las vibrisas (Figura 15A) (Meyer y cols., 2010; Wimmer y cols., 2010). La distribución de los axones marcados se localizó mediante un mapa plano (ver apartado 1.1) lo que mostró una alta densidad de

axones marcados en la zona de los barriles localizados rostral y medialmente; observándose en los barriles D7/E6-7 un marcado axónico coincidente en los cuatro experimentos (Figura 15B).

En la región de S1BF se observó un plexo denso de axones marcados en la capa 5 superficial (capa 5a), debajo de los barriles de capa 4. Se pudieron observar axones que ascendían por los septa (región entre barriles) en capa 4, y alcanzaban la capa 1 donde arborizaban de forma profusa formando un nuevo plexo notable de axones marcados. La capa 6 y 5b contenía axones marcados ascendiendo, prácticamente sin ramificar, hasta la capa 5a (Figura 15A). Se encontraron algunas neuronas piramidales marcadas retrógradamente de forma aislada en la capa 5b debido a un transporte del BDA desde los terminales axónicos de dichas neuronas en Po en la zona donde se localizó la inyección del trazador. Se observaron somas neuronales, árbol dendrítico y segmento inicial del axón marcados, lo que se consideró como contaminación. Sin embargo, no se observaron colaterales axónicas marcadas de dichas neuronas piramidales, las cuales ascienden a la capa 5a (Feldmeyer, 2012).

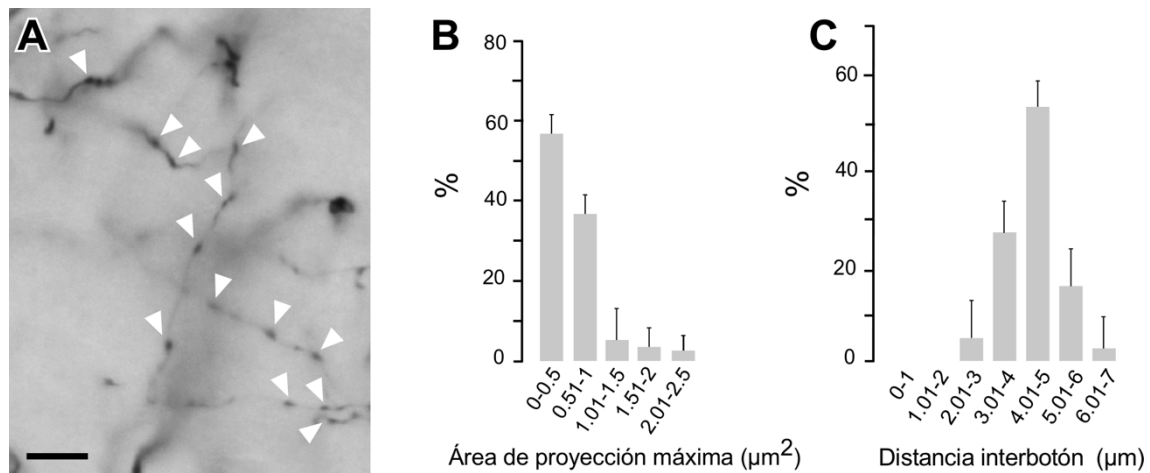


**FIGURA 15. Experimentos de trazado anterógrado poblacional mediante depósitos de BDA en Po. A:** Localización de los depósitos en el núcleo Po (Caso 5-8) y de los axones marcados en la región de S1BF. AP indica la distancia (en mm) en el eje anteroposterior respecto a Bregma. La estrella blanca indica el centro de la inyección. **B:** Representación sobre el mapa plano de la región S1BF del ratón del marcado cortical obtenido en capa 5a en cada experimento. Los asteriscos marcan los barriles con marcado axonal en 5a coincidente en los 4 casos (D7/E6-7). Los valores en la parte superior del mapa indican la distancia respecto a B (Bregma) en mm. Escala = 250  $\mu$ m.

Un análisis con el objetivo de 100x bajo el microscopio óptico de los axones marcados en capa 5a reveló que los axones presentaban una alta densidad de varicosidades separadas entre sí por segmentos interbotón, dando un aspecto arrosariado a estos axones (Figura 16A). Se dibujaron las varicosidades (N = 400) (ver apartado 1.1) obteniéndose



una media de área de proyección máxima de  $0,5 \mu\text{m}^2 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$  (Figura 16B), así como una longitud de segmento inter-botón media de  $5,2 \pm 1,74 \mu\text{m}$  (Figura 16C).



**FIGURA 16. Visualización y análisis de los axones a 100x en la capa 5a de S1BF.** **A:** Visualización a 100x de los axones marcados y sus varicosidades de varios tamaños (cabezas de flecha). **B:** Distribución de áreas de proyección máxima de las varicosidades de los axones marcados medidas al microscopio óptico (100x). **C:** Distribución de longitudes de segmentos inter-botón de los axones marcados medidos al microscopio óptico (100x). Escala =  $5 \mu\text{m}$ .

## 2. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS BOTONES SINÁPTICOS TÁLAMO-CORTICALES MARCADOS EN S1BF

### 2.1. Caracterización morfológica de los botones sinápticos del núcleo VPMdm talámico en la capa 4 de S1BF

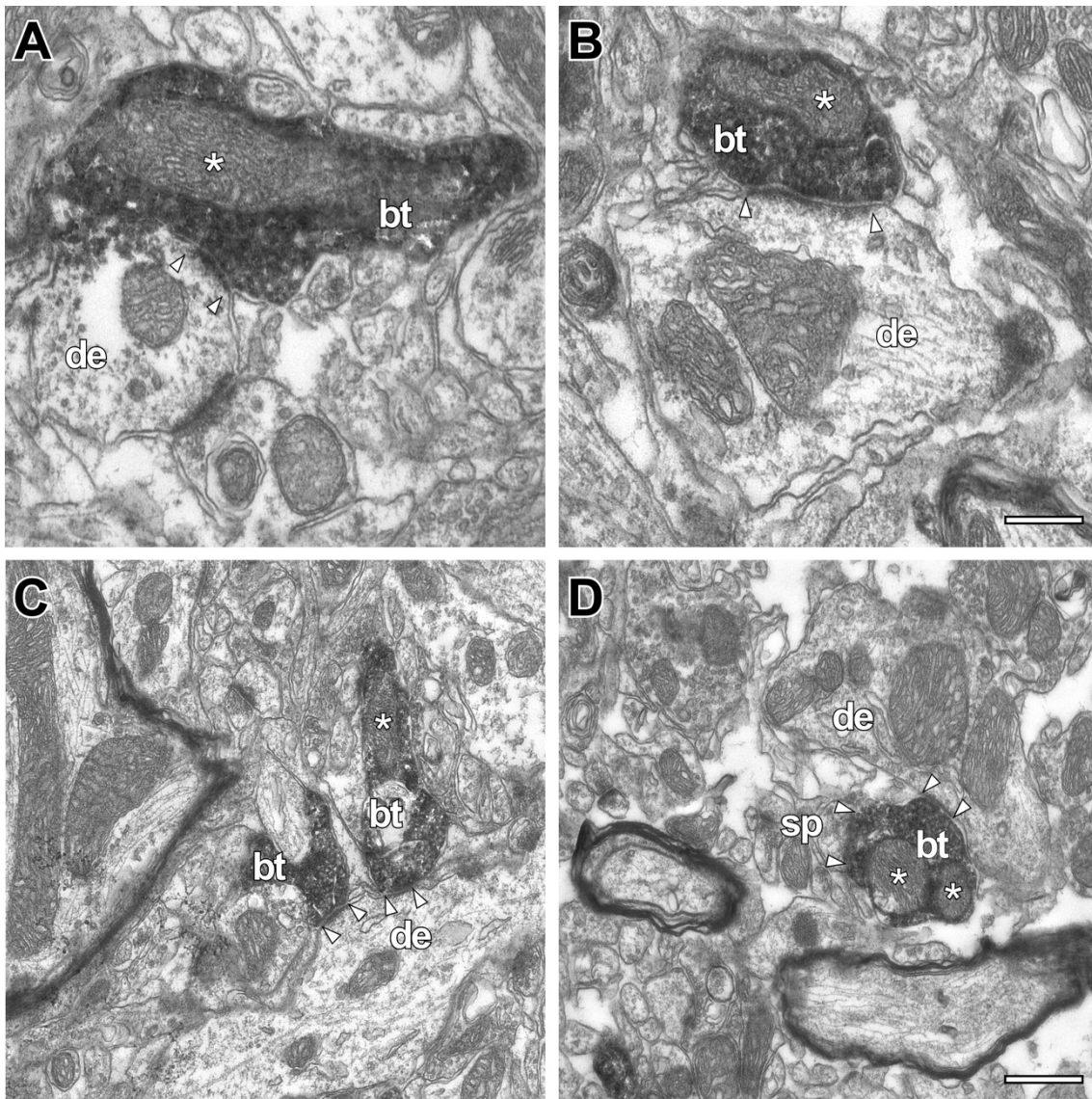
Las secciones coronales adyacentes a las analizadas en microscopía óptica (segunda serie), que contenían el marcado más denso de axones en capa 4 de S1BF fueron procesadas para un análisis detallado de la morfología de los botones sinápticos a nivel de TEM (ver Materiales y Métodos). Se identificaron botones sinápticos marcados con BDA de manera individual, los cuales fueron fotografiados en secciones ultrafinas consecutivas para posteriormente realizar reconstrucciones tridimensionales, así como obtener medidas de diferentes parámetros estructurales implicados en la transmisión sináptica y en procesos de plasticidad. Este análisis se ha restringido únicamente a la zona central de los barriles D7-8/E7 en los cuatro casos mencionados.

Un total de 64 botones sinápticos marcados con BDA de los diferentes experimentos (Caso 1: N = 15; Caso 2: N = 15; Caso 3: N = 15; Caso 4: N = 19) han sido completamente reconstruidos y analizados. El muestreo de dichos botones se ha realizado de manera aleatoria, ya que cualquier botón marcado localizado dentro de la región de interés se ha fotografiado de forma seriada en las secciones ultrafinas.

En estas secciones, un botón sináptico se ha considerado “completo” cuando ha sido posible seguir el axón en ambas direcciones (botón tipo *en passant*; N = 42) o por el contrario, el ensanchamiento axónico correspondiente al botón se ha seguido hasta su desaparición en el tejido (botón de tipo terminal; N = 22). La sinapsis se ha identificado por la presencia de dos membranas distintas dispuestas paralelamente (pre- y postsináptica) separadas por una hendidura sináptica y una banda de material electrónico en el citoplasma adherido a la membrana postsináptica (Gray, 1959a; 1959b; Peters y Palay, 1996).

Los botones sinápticos marcados por el trazador han sido identificados gracias al oscurecimiento del citoplasma producido por el producto de la reacción con DAB (ver Materiales y Métodos). Además, en todos los botones considerados, las mitocondrias localizadas en su interior han sido claramente visibles para su reconstrucción volumétrica. En algunos botones (N = 12) el marcado ha sido lo suficientemente leve como para distinguir las vesículas sinápticas, las cuales han sido también reconstruidas. Además, se ha estimado el número total de vesículas dentro de cada botón mediante el método del disector físico, con un porcentaje de error de estimación del 1-5%. Sin embargo, en ninguno de los botones sinápticos ha sido posible distinguir la densidad presináptica.

Los botones sinápticos marcados de los TCAs procedentes del núcleo VPMdm talámico analizados formaban sinapsis de tipo asimétrica (excitatoria) (Figura 17 y 18). Estas sinapsis se establecían sobre segmentos dendríticos de diferente calibre (20%) (Figura 17), incluso, ocasionalmente, dos botones han formado sinapsis con el mismo segmento dendrítico (Figura 17C). Sin embargo, la gran mayoría de sinapsis encontradas (80%) han sido sobre espinas dendríticas (Figura 18). No se ha observado ningún contacto sináptico entre un botón marcado y un soma neuronal.



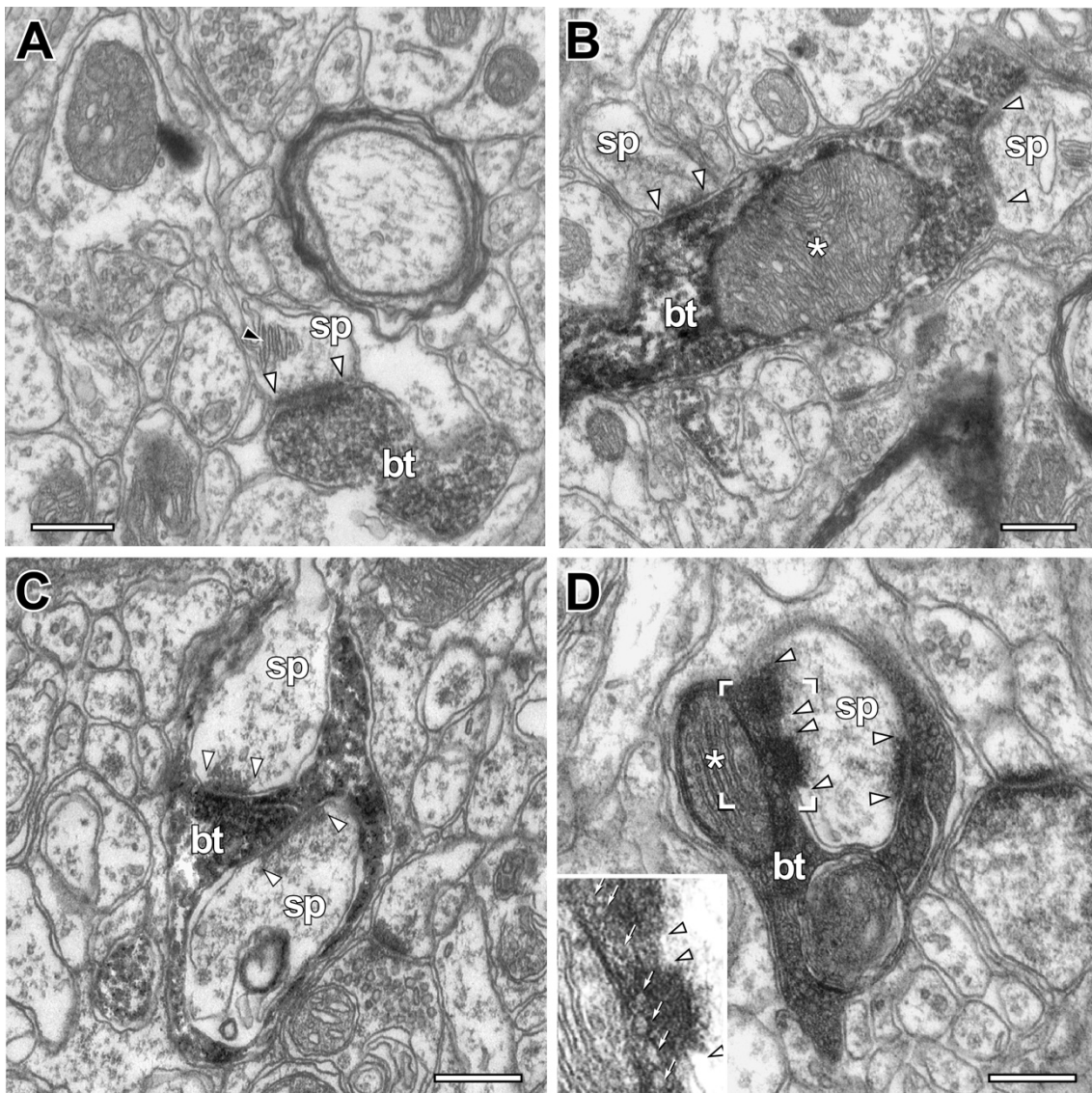
**FIGURA 17. Microfotografías electrónicas de botones TCs marcados con BDA procedentes del VPMdm (bt) estableciendo contactos sinápticos con segmentos dendríticos (de) en la capa 4 de S1BF. A-B:** Botones sinápticos de VPMdm haciendo sinapsis con segmentos dendríticos. **C:** Dos botones sinápticos de VPMdm sinaptando con el mismo segmento dendrítico. **D:** Un botón de VPMdm estableciendo sinapsis con un segmento dendrítico y con una espina dendrítica (sp). En todas las microfotografías la extensión de las PSDs se indican con dos cabezas de flecha; y las mitocondrias aparecen indicadas con un asterisco. Nótese que las PSDs son no perforadas. Escalas: A-B = 0,25  $\mu$ m; C-D = 0,5  $\mu$ m.

Alrededor del 53% de los botones analizados han resultado ser multisinápticos, es decir, han formado sinapsis con 2 o más elementos postsinápticos. Se han encontrado botones estableciendo contacto sináptico con dos, tres y hasta cuatro espinas dendríticas diferentes. Incluso botones sinaptando con un segmento dendrítico y además con una, dos e incluso tres espinas dendríticas (Figura 17D, 18B-C).



En un alto porcentaje de los botones de VPMdm se ha observado que en la región de la membrana donde se encontraba la sinapsis, esta se ha dispuesto de forma cóncava rodeando, casi en su totalidad, la cabeza de la espina dendrítica, aumentando así la superficie de aposición entre ambos perfiles (Figura 18C-D). Además, en algunos casos, se han observado unas protrusiones procedentes de la cabeza de la espina, las cuales quedaban totalmente envueltas por la membrana del botón, a modo de ‘intrusión’. Estas protrusiones no presentaban PSD.

No se ha observado ninguna varicosidad axónica sin especialización sináptica. Alrededor del 92% de los botones sinápticos analizados contenían una o varias mitocondrias en su interior, las cuales han sido de forma y tamaño diverso (Figura 17A-D, Figura 18B y D).



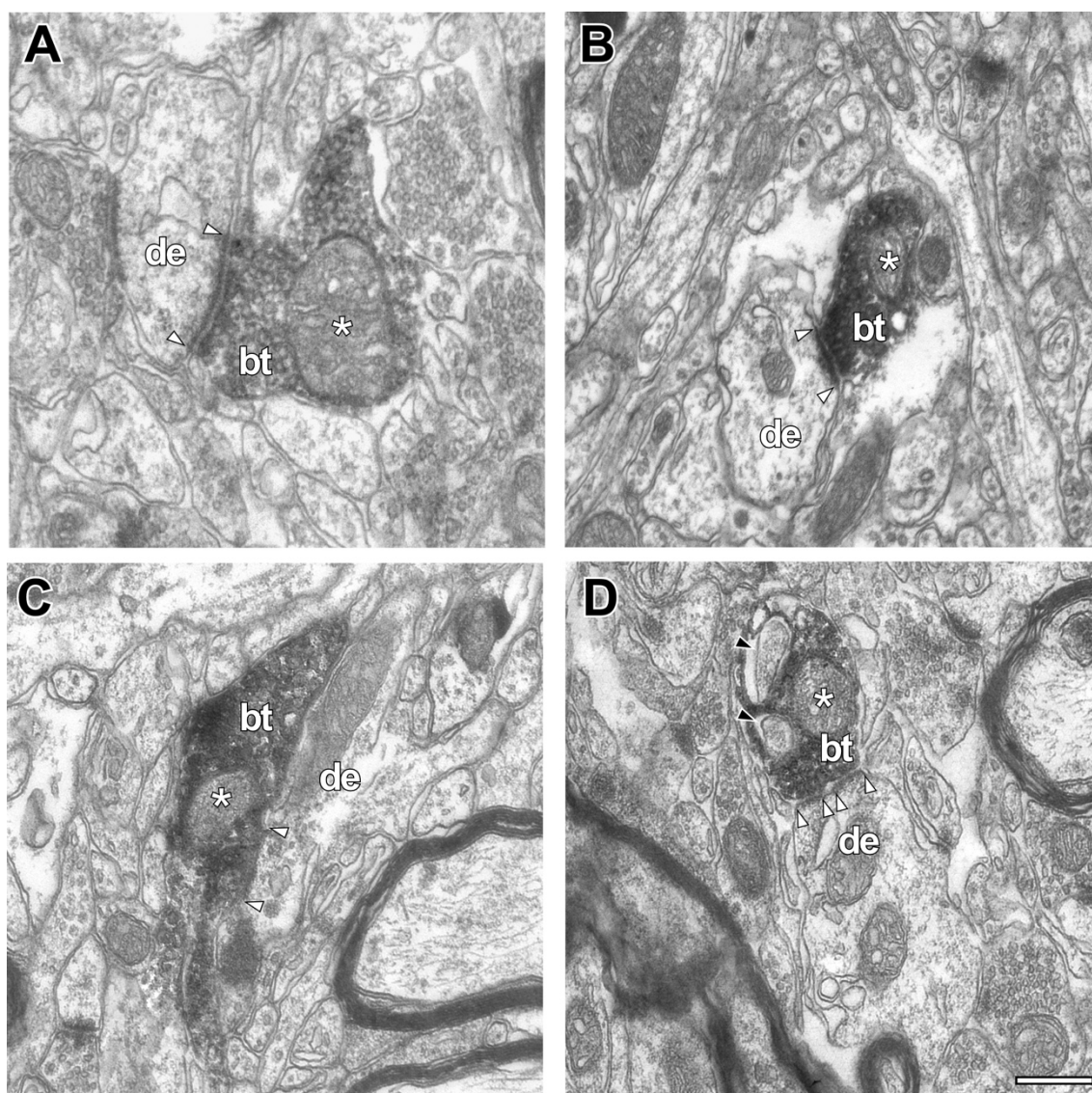
**FIGURA 18. Microfotografías electrónicas de botones TCs marcados con BDA procedentes del VPMdm (bt) estableciendo contactos sinápticos con espinas dendríticas (sp) en la capa 4 de S1BF. A:** Un botón marcado procedente de VPMdm haciendo sinapsis con la cabeza de una espina dendrítica. El aparato de la espina, el cual se extiende a lo largo del cuello de la espina, se indica con una cabeza de flecha negra. **B-C:** Dos espinas dendríticas sinaptando con el mismo botón. En (C) se observan ambas cabezas de espina envueltas por la membrana del botón presináptico. **D:** Un botón de VPMdm estableciendo dos contactos sinápticos con la misma espina dendrítica. Se observa una PSD perforada y otra no perforada. En el recuadro de abajo a la izquierda se muestra una ampliación de una de las zonas activas donde están visibles las vesículas sinápticas próximas a ella (flechas blancas). Las PSDs se indican con dos cabezas de flecha blancas y las mitocondrias aparecen indicadas con un asterisco. Escalas: A-D = 0,25  $\mu$ m.

## **2.2. Caracterización morfológica de los botones sinápticos del núcleo Po talámico en la capa 5a de S1BF**

Las secciones coronales adyacentes a las analizadas en microscopía óptica que contenían el marcado más denso de axones en capa 5a de S1BF fueron procesadas para un análisis detallado de la morfología de los botones sinápticos a nivel de TEM (ver apartado 2.1). Este análisis se ha restringido únicamente a la capa 5a, a la zona localizada debajo de los barriles, en los cuatro casos seleccionados con inyección de BDA en el núcleo Po talámico.

Un total de 74 botones sinápticos marcados con BDA de los diferentes experimentos (Caso 5: N = 12; Caso 6: N = 11; Caso 7: N = 35; Caso 8: N = 16) han sido completamente reconstruidos y analizados. El muestreo de dichos botones se ha realizado de manera similar al muestreo realizado para botones marcados procedentes del núcleo VPMdm talámico (ver apartado 2.1). Sólo en 12 botones marcados se ha podido realizar la reconstrucción de las vesículas sinápticas localizadas dentro del botón.



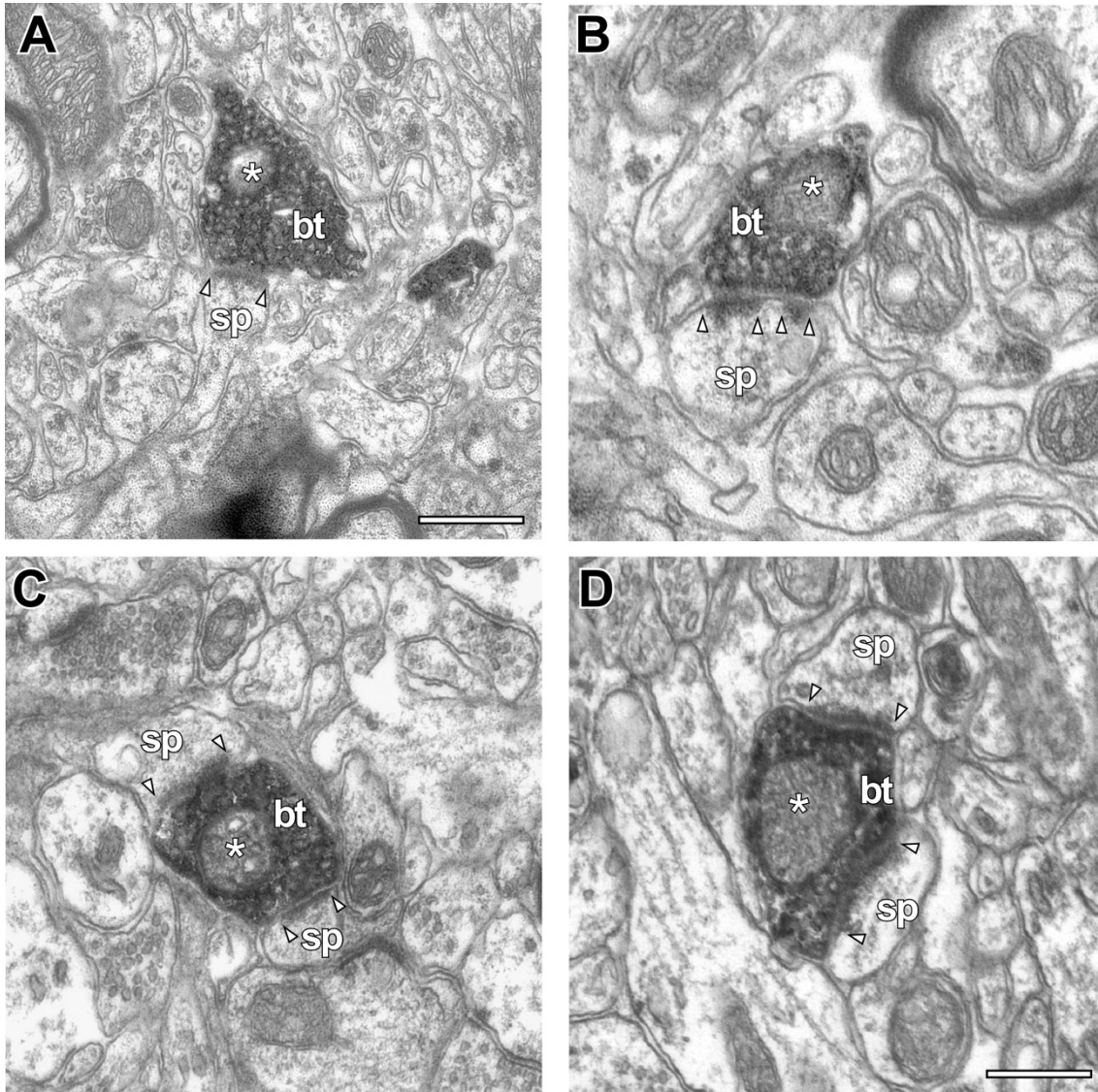


**FIGURA 19. Microfotografías electrónicas de botones TCs marcados con BDA procedentes del Po (bt) estableciendo contactos sinápticos con segmentos dendríticos (de) en la capa 5a de S1BF. A-C:** Botones sinápticos de Po estableciendo contactos sinápticos con segmentos dendríticos. Se observa un botón sináptico no marcado haciendo sinapsis con el mismo segmento dendrítico en A. Nótese que todas las PSDs (cabezas de flecha) son no perforadas. **D:** Un botón de Po estableciendo sinapsis con un segmento dendrítico. Se observa una PSD perforada (cabezas de flecha). En el botón se observan protrusiones dendríticas (cabezas de flecha negra) envueltas por la membrana del botón. Las mitocondrias aparecen indicadas con un asterisco. Escala: A-D = 0,5  $\mu$ m.

Los botones sinápticos marcados con BDA de los TCAs procedentes del núcleo Po talámico analizados formaban sinapsis de tipo asimétrica (excitatoria) (Figura 19 y 20). Al igual que en el caso de VPMdm, las sinapsis se establecían en su mayoría sobre espinas dendríticas (Figura 20), y en menor medida sobre segmentos dendríticos (Figura 19) (82% y 18% respectivamente). No se ha observado ningún contacto sináptico entre un botón marcado y un soma neuronal. Además, sólo alrededor de un 9% de los botones analizados

han resultado ser multisinápticos. Estos sinaptaban como máximo con dos elementos, tanto dos segmentos dendríticos, como dos espinas dendríticas (Figura 20C-D), sin embargo, no se han encontrado botones que establecían sinapsis con una espina y un segmento dendrítico. En los contactos sinápticos con espinas dendríticas, no se ha observado, tan frecuentemente como en botones procedentes de VPMdm, el aumento de superficie de aposición entre ambos elementos a través de la envoltura de la cabeza de la espina por parte de la membrana del botón. Tampoco ha sido frecuente la aparición de protrusiones en las cabezas de las espinas analizadas. Además, casi un 7% de los botones analizados, que poseían en su interior vesículas sinápticas, no formaban contacto sináptico.

El porcentaje de botones sinápticos analizados que contenían al menos una mitocondria en su interior ha sido menor que en los botones procedentes de VPMdm (87,8%), además, en la mayoría de ellos se ha observado solamente una mitocondria (Figura 19 y 20).



**FIGURA 20. Microfotografías electrónicas de botones TCs marcados con BDA procedentes del Po (bt) estableciendo contactos sinápticos con espinas dendríticas (sp) en la capa 5a de S1BF. A-B:** Botones sinápticos marcados procedentes de Po haciendo sinapsis con la cabeza de una espina dendrítica. En (A) se observa el cuello de la espina. En (A) la PSD es no perforada y en (B) es perforada (cabezas de flecha). **C-D:** Dos espinas dendríticas sinaptando con el mismo botón. Las PSDs son no perforadas (cabezas de flecha). En botones procedentes de Po no suele observarse la membrana del botón envolviendo a la cabeza de la espina dendrítica. Las mitocondrias aparecen indicadas con un asterisco. Escalas: A = 0,5  $\mu\text{m}$ ; B-D = 0,25  $\mu\text{m}$ .



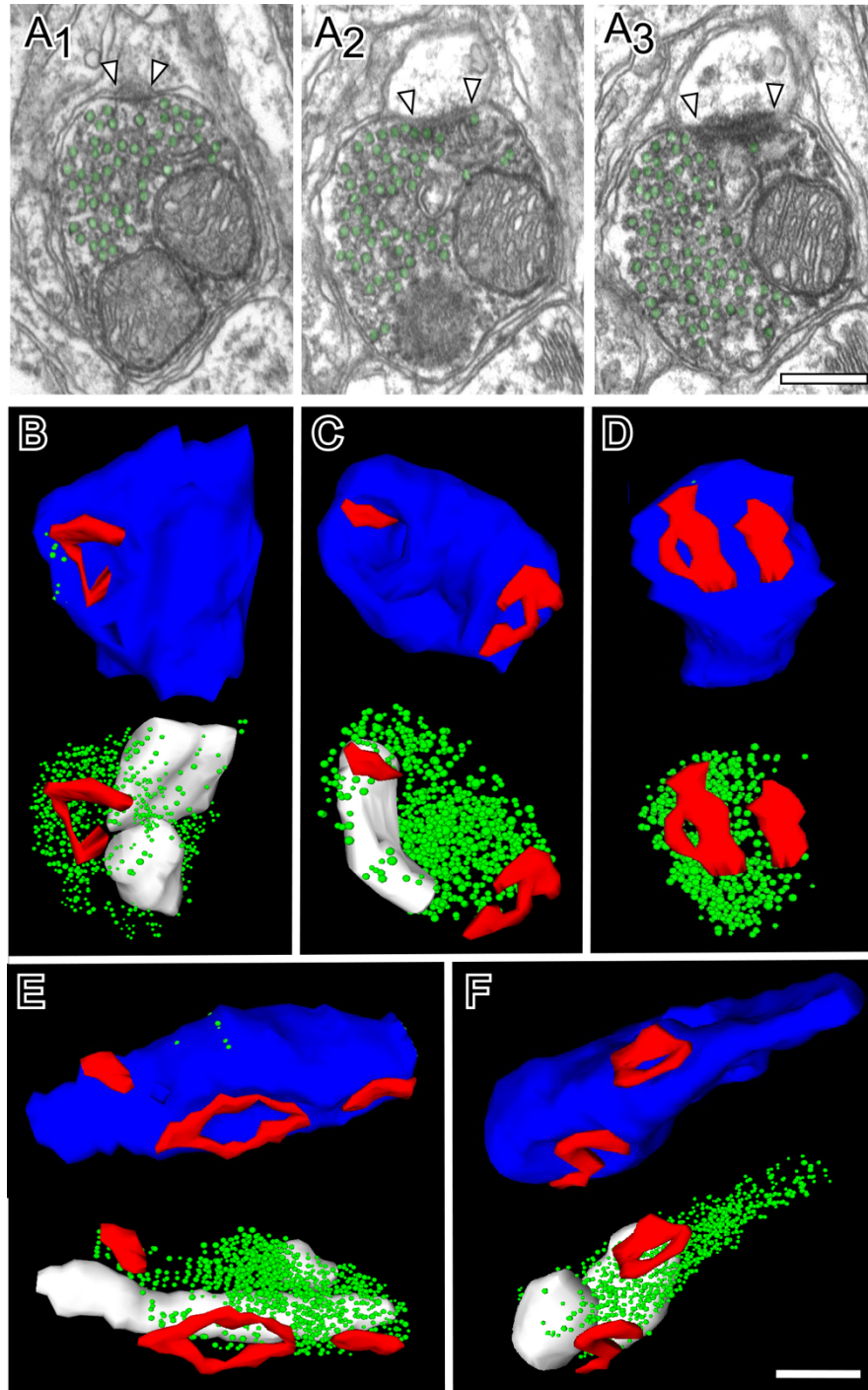
### 3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA DENSIDAD POSTSINÁPTICA

#### **3.1. Caracterización morfológica de la PSD correspondiente a la STC de los botones del núcleo VPMdm**

Se han reconstruido y medido un total de 105 PSDs con TEM y un total de 19 PSDs con FIB/SEM, correspondientes a los perfiles postsinápticos (segmentos y espinas dendríticas) a los botones TCs procedentes del núcleo VPMdm talámico. Una PSD se ha considerado “completa” cuando su perímetro se ha podido seguir completamente en todas las secciones ultrafinas consecutivas desde su aparición hasta su completa desaparición en el tejido (Figura 21A<sub>1-3</sub>).

Dentro de todas las PSDs analizadas se han observado dos morfologías principales con representación similar: PSDs simples o no perforadas (~ 48%) con una única, y siempre continua PSD, tipo macular (Figura 21C y E); y PSDs perforadas (~ 52%) con dos zonas, separadas, próximas, y habitualmente conectadas entre sí, identificadas como PSD, dentro del mismo perfil postsináptico (Figura 21B-F). En el conjunto de PSDs perforadas se han distinguido tres morfologías diferentes: PSDs en anillo (PSD con un espacio central) (9,5%) (Figura 21E-F), PSDs en herradura (32%) (Figura 21B-C, F), y PSDs fragmentadas (dos PSDs separadas y próximas entre sí pero sin conexión entre ellas) (6%) (Figura 21D).

Atendiendo a la localización de las PSDs analizadas dentro del perfil postsináptico, se ha observado que la mayoría de las PSDs perforadas se localizan en espinas dendríticas y un bajo porcentaje de ellas en segmentos dendríticos (46% y 6% respectivamente).

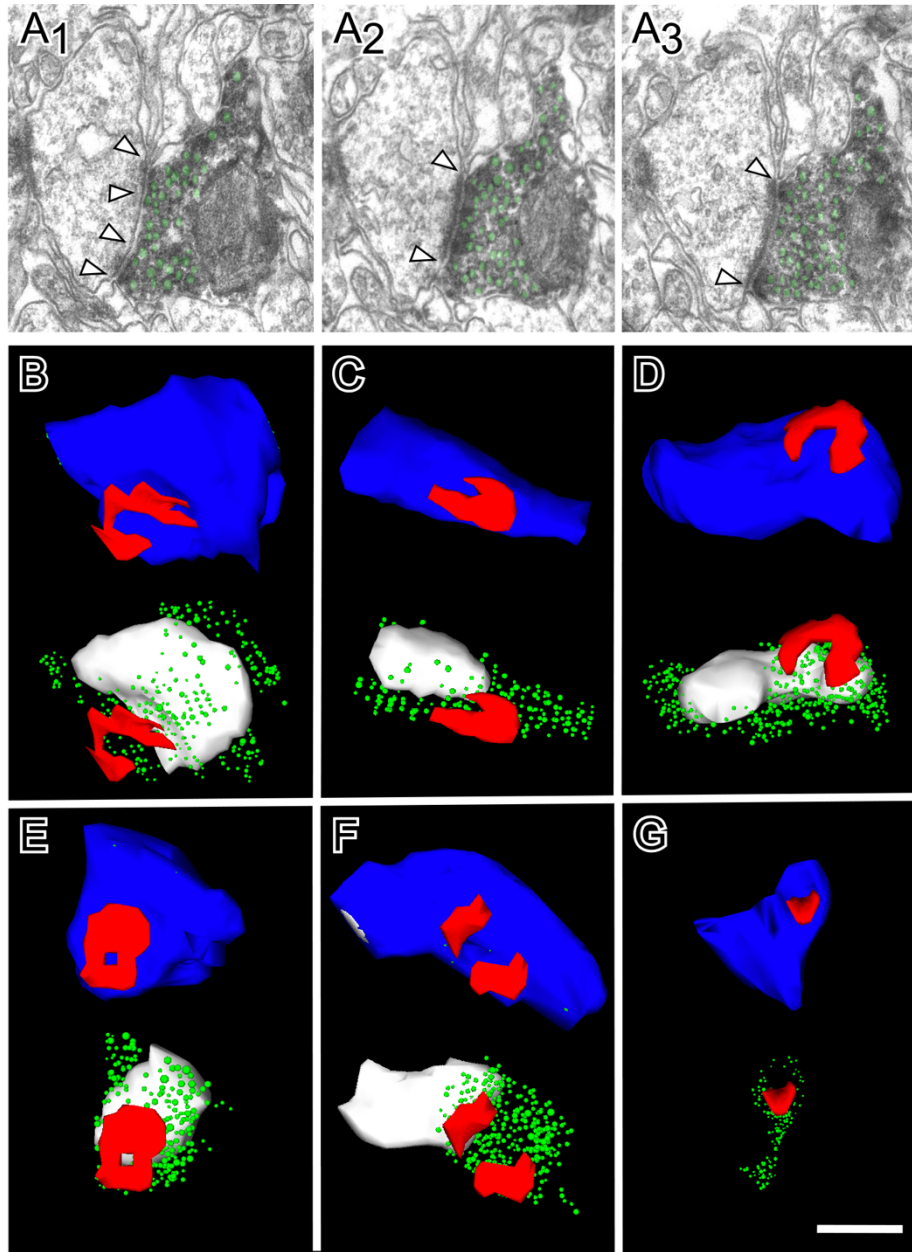


**FIGURA 21. Reconstrucción 3D realizada con OpenCAR de botones sinápticos procedentes de VPMdm (azul). A<sub>1-3</sub>:** Tres secciones ultrafinas consecutivas de un botón sináptico procedente de VPMdm. Se pueden observar vesículas sinápticas (resaltadas en verde) distribuidas por todo el terminal. La PSD está indicada por dos cabezas de flecha. **B-F:** Ejemplos de reconstrucciones 3D de botones individuales. Las mitocondrias (blanco) y las vesículas sinápticas (verde) se muestran en la parte inferior. Nótese los diferentes tipos de PSDs (rojo): no perforadas (C y E); PSD perforada en anillo (E y F); PSD perforada en herradura (B-C y F); PSD fragmentada (D). Escalas: A-F = 0,25  $\mu$ m.

### **3.2. Caracterización morfológica de la PSD correspondiente a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo Po**

Se han analizado un total de 80 PSDs correspondientes a los perfiles postsinápticos a los botones TCs procedentes del núcleo Po talámico (Figura 22A<sub>1-3</sub>). Se han observado los mismos tipos morfológicos obteniéndose un mayor porcentaje de PSDs no perforadas (Figura 22G) frente a perforadas (35%), incluyendo los tres tipos: PSD en anillo (10%) (Figura 22E), PSD en herradura (16%) (Figura 22B-D) y PSD fragmentada (9%) (Figura 22F). La prevalencia de las distintas morfologías de PSDs perforadas ha sido similar a la observada en las sinapsis analizadas correspondientes a los botones de VPMdm.

Atendiendo a su localización dentro del perfil postsináptico, sólo un 4% de PSDs perforadas se observaron en segmentos dendríticos, frente a un 31% localizado en espinas dendríticas. Una distribución similar a la observada en la localización de las PSDs perforadas en la STC de los botones de VPMdm.



**FIGURA 22. Reconstrucción 3D realizada con OpenCAR de botones sinápticos procedentes de Po (azul).** A<sub>1-3</sub>: Tres secciones ultrafinas consecutivas de un botón sináptico procedente de Po. Se pueden observar vesículas sinápticas (resaltadas en verde) distribuidas por todo el terminal. La PSD está indicada por dos cabezas de flecha. B-F: Ejemplos de reconstrucciones 3D de botones individuales. Las mitocondrias (blanco) y las vesículas sinápticas (verde) se muestran en la parte inferior. Nótese los diferentes tipos de PSDs (rojo): no perforadas (G); PSD perforada en anillo (E); PSD perforada en herradura (B-D); PSD fragmentada (F). Además en el botón representado en (G) no se observó mitocondria. Escalas: A-F = 0,25  $\mu$ m.

#### 4. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL PERFIL POSTSINÁPTICO: ESPINAS VS. SEGMENTOS DENDRÍTICOS

##### **4.1. Caracterización morfológica de los perfiles postsinápticos correspondientes a la STC de los botones del núcleo VPMdm**

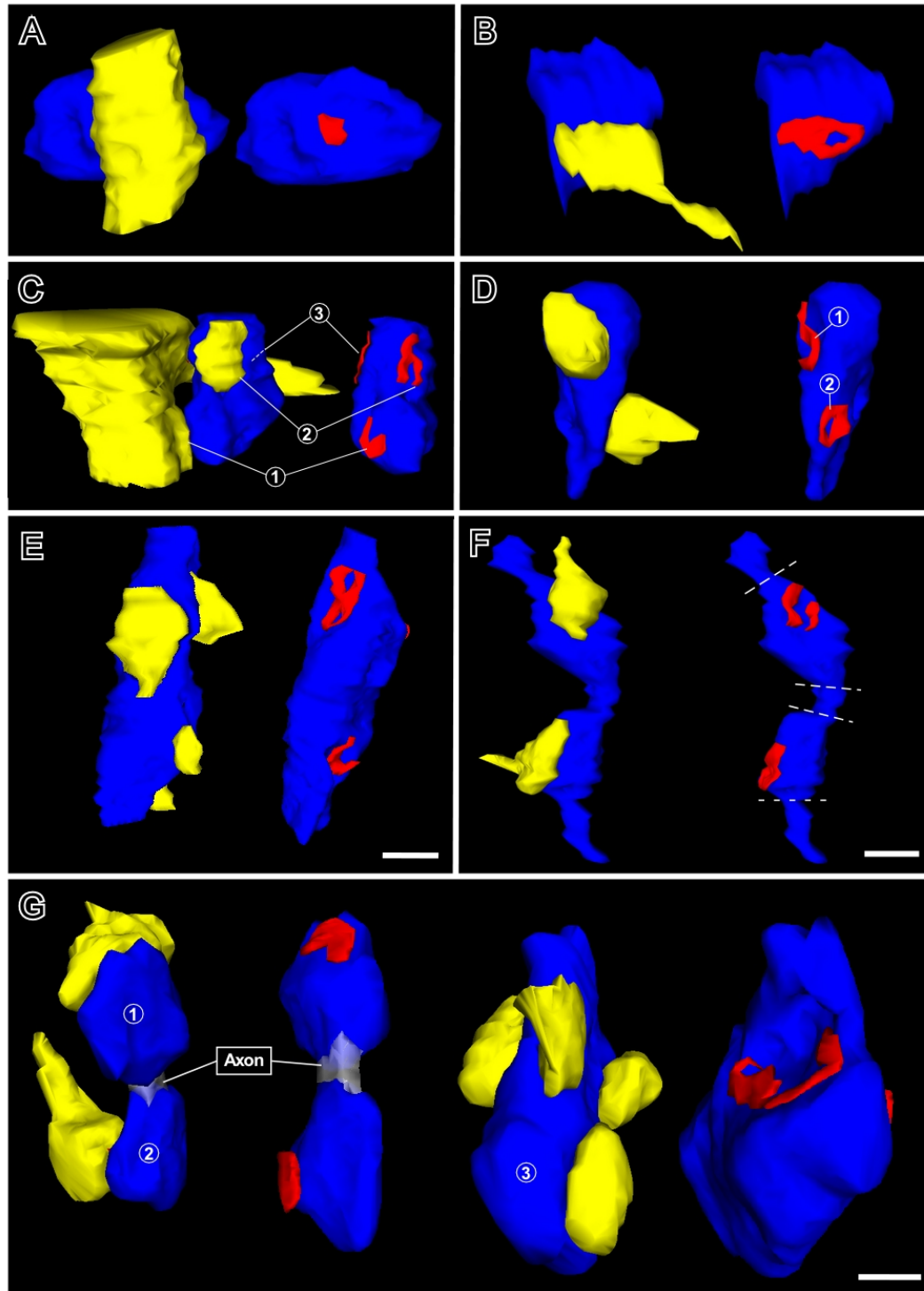
Como ya se ha mencionado la mayoría de los botones sinápticos analizados procedentes del núcleo VPMdm establecieron contacto sináptico con espinas dendríticas, e incluso, en numerosos casos, con más de una espina (Figura 23). Se han analizado un total de 74 espinas dendríticas sinaptando con botones marcados. En la mayoría de los casos, sólo se ha podido reconstruir la cabeza de la espina en su totalidad y el segmento inicial del cuello de la espina. En un pequeño número de espinas (20/74) se ha podido seguir el cuello de la espina hasta su origen en un segmento dendrítico, determinando así su morfología. Se ha observado una mayor prevalencia de espinas dendríticas tipo champiñón (Figura 23B, F-G).

Un aspecto interesante observado ha sido que el 15% de las espinas dendríticas analizadas que establecían sinapsis con un botón procedente del VPMdm, establecían una sinapsis adicional de tipo simétrico (inhibitoria), localizada siempre en la cabeza de la espina dendrítica.

Los segmentos dendríticos postsinápticos a los botones marcados del VPMdm analizados se han reconstruido hasta el final de la serie de fotografías de secciones ultrafinas que contenían a dichos botones. En ningún caso se ha obtenido el segmento dendrítico en su totalidad, sin embargo, en las porciones reconstruidas no se han observado espinas dendríticas (salvo en un caso), por lo que podrían tratarse de células no espinosas e inhibitorias (interneuronas) (Figura 23A, C).

Se ha observado una alta proporción de botones multisinápticos (53%) (Figura 23C-G). Estos establecían como máximo cuatro contactos sinápticos (Figura 23E, G), incluyendo en varios casos, sinapsis con segmentos y espinas dendríticas (Figura 23C). Además, se ha observado una considerable proporción de cabezas de espina parcialmente envueltas por la membrana de los botones sinápticos del VPMdm. Esta superficie incluía siempre la PSD, creando además una superficie de aposición adicional entre los elementos pre- y

postsináptico mucho más extensa que la que presentan las espinas dendríticas ‘no intrusivas’. También, se han encontrado protrusiones en algunas cabezas de espinas dendríticas, las cuales aparecían envueltas también por la membrana del botón sináptico.





**FIGURA 23. Reconstrucción 3D realizada con OpenCAR de botones sinápticos procedentes de VPMdm (azul) estableciendo contactos sinápticos con segmentos y espinas dendríticas (amarillo).** **A:** Un botón sinaptando con un segmento dendrítico con una PSD no perforada. **B:** Un botón estableciendo una sinapsis con una espina dendrítica. La PSD es perforada en anillo. **C:** Un botón haciendo sinapsis con tres elementos postsinápticos: (1) segmento dendrítico y (2-3) espinas dendríticas. Nótese que los contactos 1 y 3 pertenecen a la misma dendrita. **D:** Un botón sinaptando con dos espinas dendríticas con PSDs perforadas: (1) perforada en herradura y (2) perforada en anillo. **E:** Un botón estableciendo cuatro sinapsis con cuatro espinas dendríticas. Las PSDs son diferentes en forma y tamaño. **F:** Segmento axónico con dos botones *en passant*, cada uno estableciendo sinapsis con una espina dendrítica. Se observa una PSD fragmentada y una no perforada. Los extremos de los botones sinápticos están indicados por líneas discontinuas. **G:** Tres botones marcados (1-3), encontrados muy cercanos en la muestra, estableciendo uno (1-2) y cuatro (3) contactos sinápticos con espinas dendríticas. Se aprecia una gran diferencia de tamaño entre ellos. Todas las PSDs se representan en rojo. Escalas: A-G = 0,5  $\mu$ m.

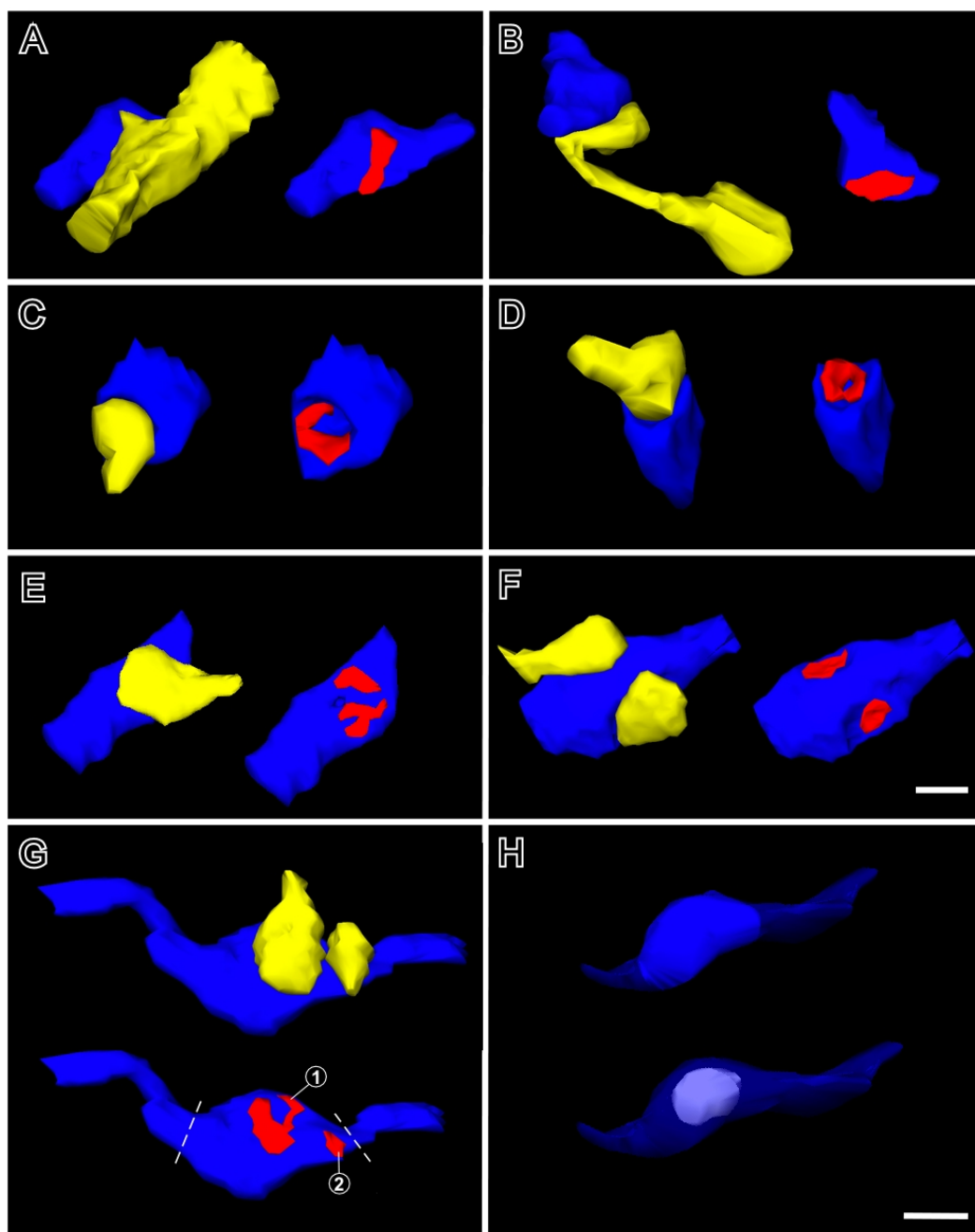
#### 4.2. Caracterización morfológica de los perfiles postsinápticos correspondientes a la sinapsis tálamo-cortical de los botones del núcleo Po

La mayoría de los botones sinápticos analizados procedentes del núcleo Po talámico establecieron contacto sináptico con espinas dendríticas, sin embargo, al contrario que en los botones de VPMdm, la sinapsis se estableció con una sola espina dendrítica en la mayor parte de los botones analizados (Figura 24B-E). Se han analizado un total de 66 espinas dendríticas sinaptando con botones marcados. En los casos donde se ha podido seguir el cuello de la espina hasta su origen, se ha observado una mayor prevalencia de espinas dendríticas de tipo champiñón (Figura 24B).

Se ha observado que el 18% de las espinas dendríticas analizadas que establecían sinapsis con un botón procedente del Po, establecían una sinapsis adicional de tipo simétrico (inhibitoria) localizada siempre en la cabeza de la espina dendrítica.

En ningún caso se ha obtenido el segmento dendrítico en su totalidad en las sinapsis establecidas entre botones marcados del Po y segmentos dendríticos. Las porciones reconstruidas de estos mismos no presentaban espinas dendríticas por lo que podrían tratarse de células no espinosas e inhibitorias (interneuronas) (Figura 24A).

Además, al contrario que en los botones sinápticos analizados procedentes de VPMdm, se ha observado un pequeño porcentaje de botones (~ 7%) procedentes de Po que no establecían ningún contacto sináptico, aunque poseían en su interior tanto mitocondrias como vesículas sinápticas (Figura 24H).



**FIGURA 24. Reconstrucción 3D realizada con OpenCAR de botones sinápticos procedentes de Po (azul) estableciendo contactos sinápticos con segmentos y espinas dendríticas (amarillo). A:** Un botón sinaptando con un segmento dendrítico con una PSD no perforada. **B:** Un botón estableciendo una sinapsis con una espina dendrítica. La PSD es no perforada. **C:** Un botón haciendo sinapsis con una espina dendrítica cuya cabeza está parcialmente envuelta por la membrana del botón. La PSD es perforada en herradura. **D:** Un botón sinaptando con una espina dendrítica con PSD perforada en anillo. **E:** Un botón estableciendo una sinapsis perforada de tipo fragmentada con una espina dendrítica. **F:** Un botón sinaptando con dos espinas dendríticas con PSDs no perforadas. **G:** Un botón estableciendo dos contactos sinápticos con dos espinas dendríticas. Se observa una PSD perforada en herradura (1) y una PSD no perforada (2). Los extremos del botón sináptico están indicados por líneas discontinuas. **H:** Segmento axónico con un botón que no establece contacto sináptico. En el botón se observa una mitocondria (blanco) y vesículas sinápticas (no representadas). Se puede distinguir claramente la región varicosa (azul) de la no varicosa (azul transparente). Escalas: A-G = 0,5  $\mu$ m.

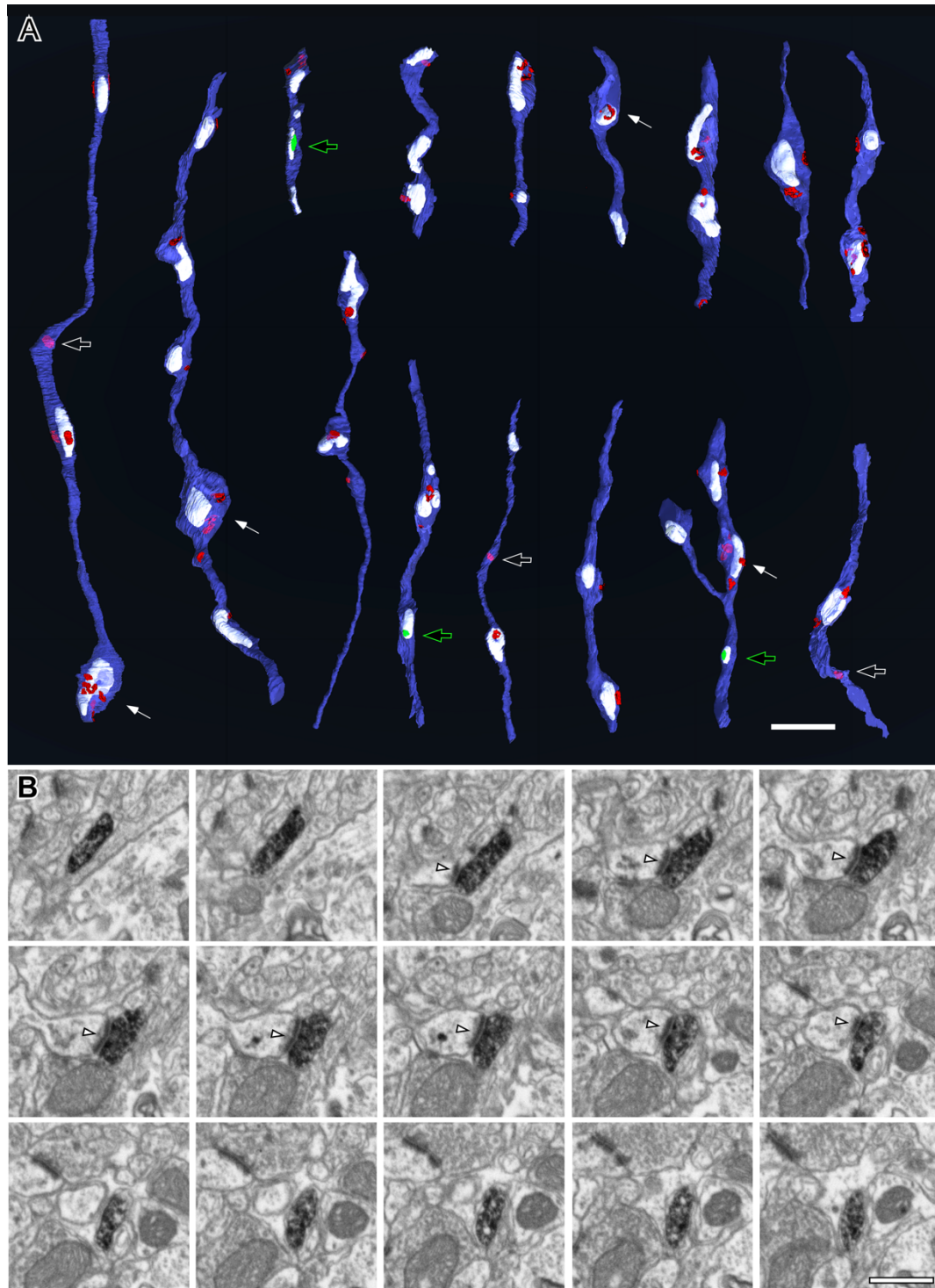


La proporción de botones multisinápticos ha sido muy baja (~ 9%), estableciéndose como máximo dos contactos sinápticos por botón (Figura 24F-G). Además, se ha observado también una menor proporción de cabezas de espina parcialmente envueltas por la membrana de los botones sinápticos del Po (14%) (Figura 24C), creando una superficie de aposición adicional entre los elementos pre- y postsináptico. También, se han encontrado protrusiones en algunas cabezas de espinas dendríticas (6%).

## 5. ANÁLISIS CON FIB/SEM DE LOS AXONES PROCEDENTES DEL VPMdm Y SUS ELEMENTOS POSTSINÁPTICOS

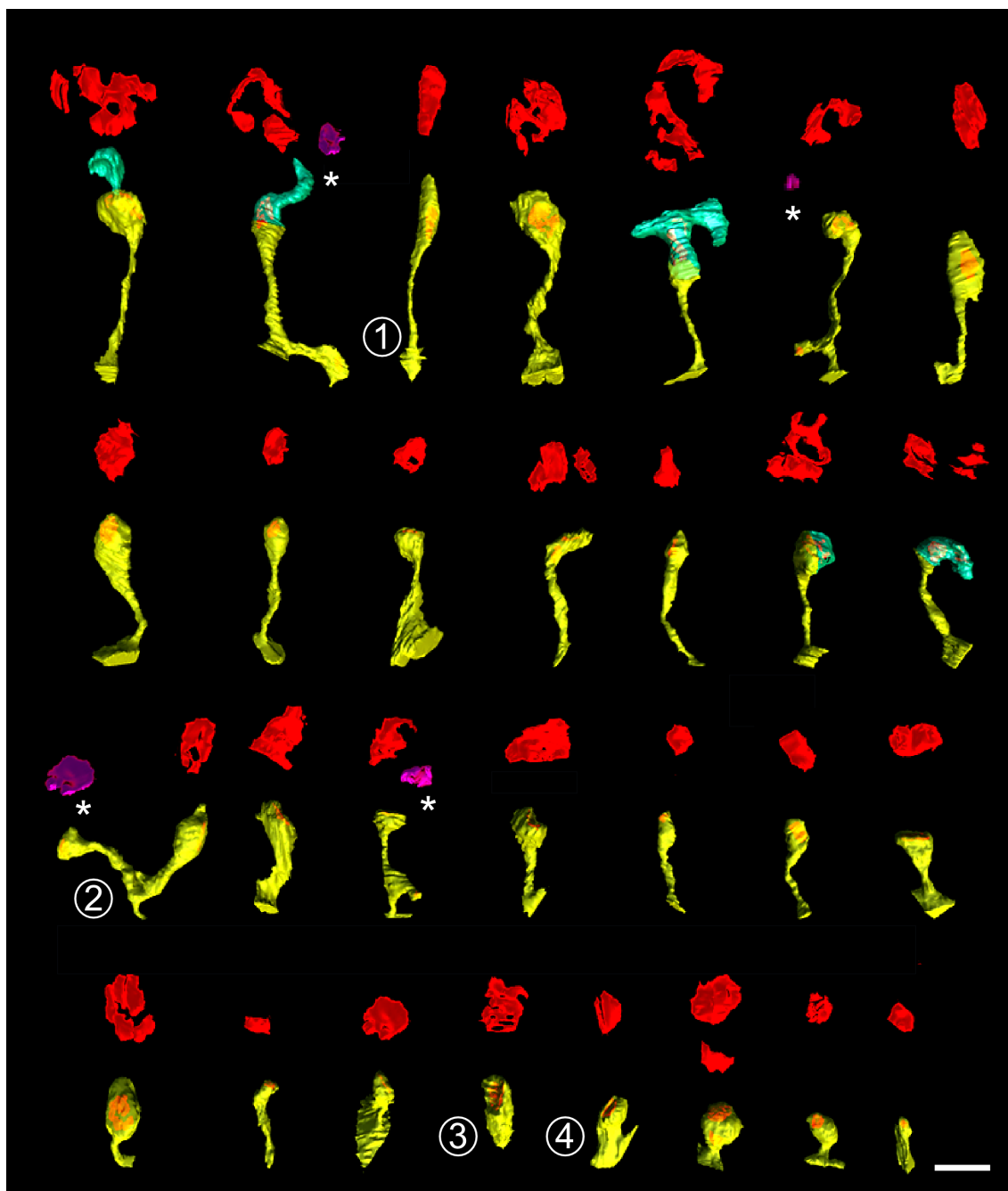
Se han analizado con FIB/SEM y reconstruido tridimensionalmente un total de 165  $\mu\text{m}$  de axón marcado con BDA procedente de VPMdm en el neuropilo de la capa 4 de S1BF contenido en un volumen total de tejido de 4050  $\mu\text{m}^3$ . La resolución (5 nm por pixel) utilizada para la obtención de grandes bloques de imágenes fue suficiente para delimitar y medir la membrana del axón, mitocondrias, PSDs y espinas postsinápticas.

En este caso, gracias a la obtención de grandes volúmenes de muestra, se han podido seguir amplias longitudes de axones marcados, por lo que se han analizado segmentos axonales ‘completos’ (botones sinápticos + segmentos inter-botón) a diferencia del análisis con TEM que se ha centrado sólo en el análisis del botón sináptico. En el volumen escaneado se han observado 15 segmentos axónicos marcados procedentes de VPMdm (uno de ellos mostraba una ramificación), que presentaron un total de 37 botones en el total de las 165  $\mu\text{m}$  de axón (Figura 25). Por tanto, la distancia inter-botón media obtenida ha sido 4,4  $\mu\text{m}$ /botón. El diámetro medio obtenido en los segmentos inter-botón fue de  $0,30 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Los 37 botones establecían en total 54 sinapsis (1,5 sinapsis/botón; 0,34 sinapsis/ $\mu\text{m}$  axónica). Aunque la mayoría de las sinapsis observadas se localizaban en botones sinápticos, tres de ellas (5,3%) aparecían en segmentos axonales no varicosos, es decir, segmentos con un diámetro menor a 0,5  $\mu\text{m}$  y que no contenían mitocondrias. De estos 37 botones sinápticos, solamente un total de 12 pudieron ser analizados con la suficiente resolución como para obtener datos cuantitativos de los mismos parámetros que en el análisis de secciones ultrafinas seriadas en TEM. Estos datos cuantitativos correspondientes a dichos botones se han incluido en la tabla con los datos obtenidos del material de TEM (Tabla 2).



**Figura 25. Reconstrucción 3D con ESPINA de segmentos axónicos marcados procedentes de VPMdm a partir de bloques de imágenes seriadas obtenidas con FIB/SEM. A:** Segmentos axónicos individuales de longitud variable (azul transparente). Las mitocondrias están resaltadas en blanco. Se observan PSDs de distinta forma y tamaño correspondientes a sinapsis con espinas dendríticas (rojo) y con segmentos dendríticos (verde; flecha con borde verde). Las flechas blancas señalan los botones sinápticos donde se observaron protrusiones de espinas envueltas por la membrana del botón. Las flechas con borde blanco señalan las PSDs localizadas en regiones axónicas no varicosas, sin mitocondrias. **B:** Microfotografías seriadas obtenidas con FIB/SEM de un axón marcado con BDA estableciendo sinapsis (cabeza de flecha) con una espina dendrítica en una región no varicosa. Escalas: A = 2  $\mu\text{m}$ ; B = 0,5  $\mu\text{m}$ .

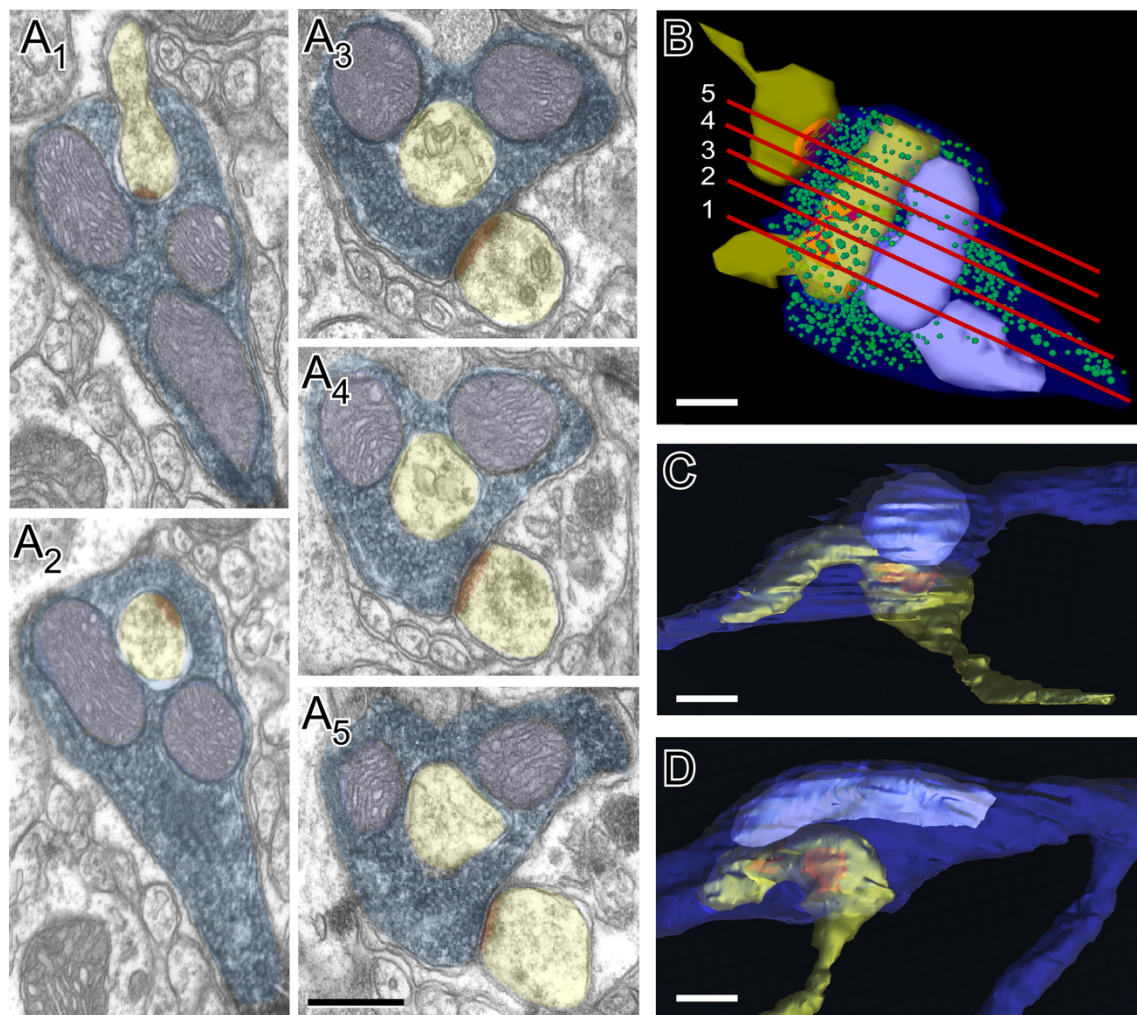
Además, se han analizado un total de 29 espinas dendríticas postsinápticas a los botones marcados de los axones de VPMdm, las cuales han sido reconstruidas en su totalidad (hasta su origen en el segmento dendrítico) (Figura 26). Estas presentaban predominantemente forma de ‘champiñón’, al igual que las espinas analizadas con TEM, aunque se han observado otras morfologías como tipo ‘filopodio’, ‘ramficada’ y ‘gruesa’. Además, las PSDs más grandes se localizaban en las espinas con cabeza de mayor tamaño. También se ha observado una proporción similar de espinas dendríticas que recibían una sinapsis de botones de VPMdm y otra sinapsis de tipo simétrica adicional por un elemento no marcado de origen desconocido.



**Figura 26. Espinas dendríticas de diferente forma y tamaño postsinápticas a botones de VPMdm reconstruidas tridimensionalmente con ESPINA a partir de bloques de imágenes seriadas obtenidas con FIB/SEM.** Ejemplos representativos de espinas con diferentes morfologías, incluyendo champiñón, filopodio (1), ramificada (2) y gruesa (3, 4). La membrana de la espina (amarillo) se ha hecho transparente para permitir la visualización de la PSD (rojo). Además, las PSDs se han aumentado al doble en la parte de arriba de cada espina para apreciar su tamaño y forma. Se observan PSDs adicionales (morado, asterisco) en algunas espinas, las cuales no correspondían a contactos con un axón marcado procedente de VPMdm. Las zonas de las espinas que aparecían insertadas en el botón están resaltadas con un sombreado verde. Escala = 0,5  $\mu$ m.

En ambas muestras, se ha observado una considerable proporción de cabezas de espina parcialmente envueltas por la membrana de los botones sinápticos del VPMdm (27%).

Además, se confirmó la existencia de protrusiones de algunas cabezas de espinas dendríticas, siendo el 13% de las espinas totales analizadas (TEM + FIB/SEM) las que poseían una protrusión envuelta también por la membrana del botón sináptico. Estas protrusiones eran del mismo calibre que el resto de la cabeza de la espina, incrementando más de 20 veces la superficie de aposición entre la espina y el botón (Figura 27).



**Figura 27. Protrusiones de espinas dendríticas incluidas en botones procedentes de VPMdm observadas en las muestras de TEM y FIB/SEM.** A<sub>1-5</sub>: Microfotografías seriadas obtenidas con TEM de un botón sináptico (azul) conteniendo una gran protrusión de una espina dendrítica (amarillo) que está sinaptando con él. Las mitocondrias están resaltadas en morado y las PSDs en rojo. **B**: Reconstrucción 3D de los elementos en (A). Las microfotografías A<sub>1-5</sub> corresponden respectivamente a los niveles de corte 1-5 indicados. Se representan también las vesículas sinápticas (verde). **C-D**: Ejemplos adicionales de FIB/SEM de espinas dendríticas con largas protrusiones insertadas en botones de VPMdm. Código de colores como en (B). Escalas = 0,25  $\mu\text{m}$ .



## 6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL

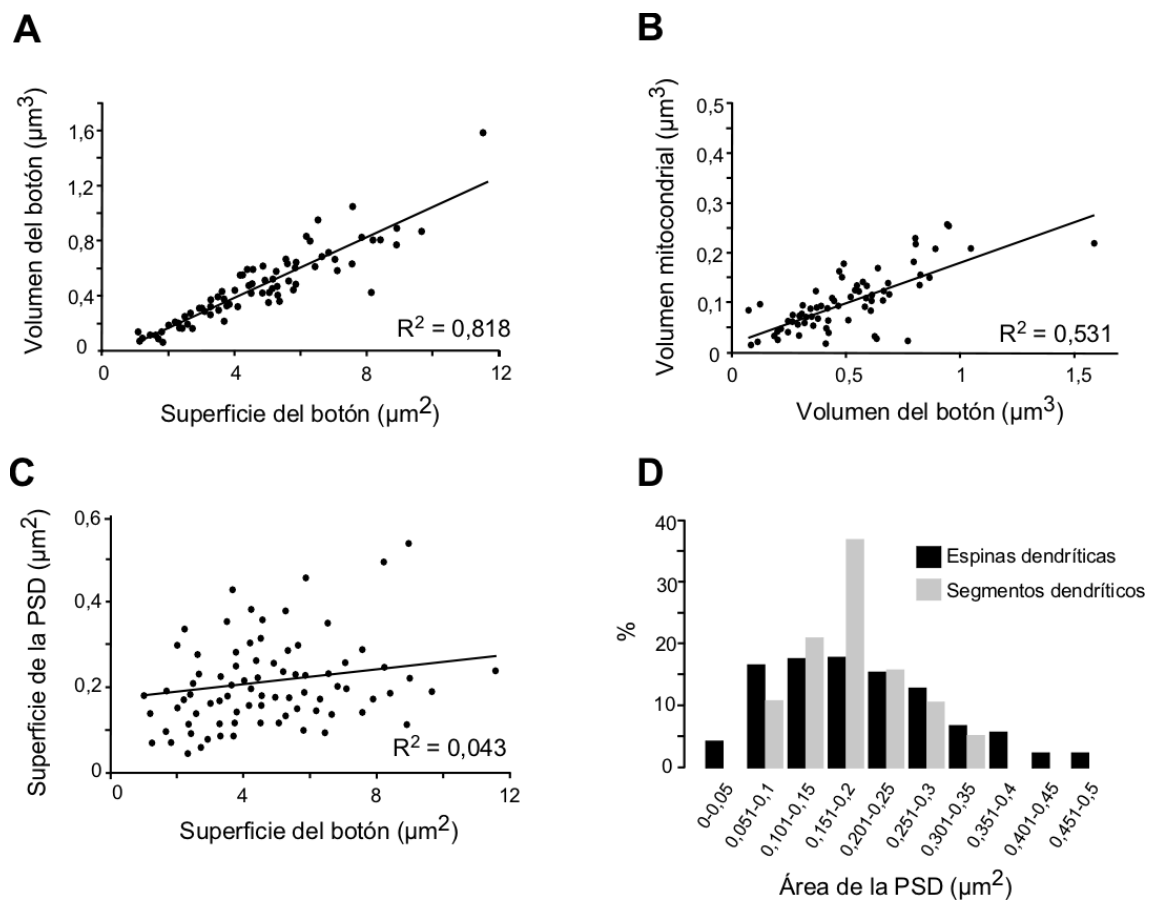
### 6.1. Análisis cuantitativo de parámetros estructurales correspondientes a la sinapsis de los botones marcados de VPMdm

Las reconstrucciones volumétricas 3D basadas en secciones ultrafinas seriadas (TEM y FIB/SEM) permitieron un análisis cuantitativo de diferentes elementos implicados en la STC (Tabla 2). Los botones sinápticos marcados de VPMdm localizados en la capa 4 de S1BF variaron sustancialmente en forma y tamaño. La media de su superficie fue  $4,67 \pm 2,20 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $1,26 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $11,58 \mu\text{m}^2$ ) con un volumen medio de  $0,46 \pm 0,27 \mu\text{m}^3$  (mínimo:  $0,06 \mu\text{m}^3$ ; máximo:  $1,59 \mu\text{m}^3$ ) (Tabla 2). Ambos valores están altamente correlacionados ( $r = 0,904$ ;  $p\text{-valor} < 0,00001$ ) (Figura 28A). Además, el tamaño del botón medido como el área de proyección máxima, es un parámetro muy útil para su comparación con el tamaño de las varicosidades axónicas medidas en diversos estudios mediante microscopía óptica en axones marcados (Figura 14; véase también Viaene y cols., 2011; Marion y cols., 2013). La media del área de proyección máxima calculada para los 76 botones analizados (TEM y FIB/SEM) ha sido de  $0,56 \pm 0,29 \mu\text{m}^2$ . Este dato es un 40% más pequeño comparado con el área de proyección máxima obtenida con el microscopio óptico con el objetivo de 100x de las varicosidades reveladas con DAB-Niquel sulfato de los axones procedentes del VPMdm en las secciones adyacentes analizadas de los mismos experimentos (ver apartado 1.1; Figura 14B). Aunque la calidad de ambas observaciones es comparable, al menos para los botones más grandes, se debe tener en cuenta que la diferencia encontrada podría deberse a una falta de muestreo de los botones más pequeños en el análisis con microscopía óptica.

Tabla 2: Análisis cuantitativo de parámetros estructurales de la sinapsis identificada entre los botones de VPMdm y sus elementos postsinápticos.

BOTÓN					
Nº de botones analizados	Sinapsis/botón	Sinapsis en espinas vs. segmentos dendríticos	Superficie del botón (µm²)	Volumen del botón (µm³)	Correlación superficie del botón vs. volumen
76	1,6	83% vs. 17%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,06-1,59 0,46 ± 0,27 0,42 0,59	r = 0,904 p < 0,00001
MITOCONDRIA					
Nº de mitocondrias analizadas	% de botones con mitocondria	% de volumen mitocondrial en el volumen total del botón	Volumen mitocondrial (µm³)	Correlación volumen del botón vs. volumen mitocondrial	
68	92%	23,03%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,01-0,25 0,99 ± 0,057 0,09 0,58	r = 0,728 p < 0,00001
VESÍCULAS SINÁPTICAS					
Nº de botones con vesículas analizadas	Nº de vesículas por botón	Correlación nº de vesículas vs. volumen del botón	Correlación nº de vesículas vs. área de la PSD		
12	Rango Media ± SD Mediana CV	r = 0,830 p = 0,00033	r = 0,710 p = 0,01		
	200-1095 740 ± 285 795 0,39				
PSD					
Nº de PSDs analizadas	% de PSDs perforadas	Superficie de la interfaz de la PSD (µm²)	Área de la PSD (µm²)	Área de la PSD en segmentos dendríticos (µm²)	Correlación superficie del botón vs. área de la PSD
124	51,43%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,03-0,47 0,21 ± 0,11 0,2 0,51	0,03-0,47 0,21 ± 0,11 0,2 0,45	r = 0,207 p = 0,02
ESPINA DENDRÍTICA					
Nº de espinas analizadas	% de espinas con una sinapsis simétrica adicional	Superficie de la cabeza de la espina (µm²)	Volumen de la cabeza de la espina (µm³)	Correlación volumen del botón vs. volumen de la cabeza de la espina	Correlación área de la PSD vs. superficie de la cabeza de la espina
92	15%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,004-0,18 0,06 ± 0,04 0,06 0,62	r = 0,095 p = 0,37	r = 0,743 p < 0,00001

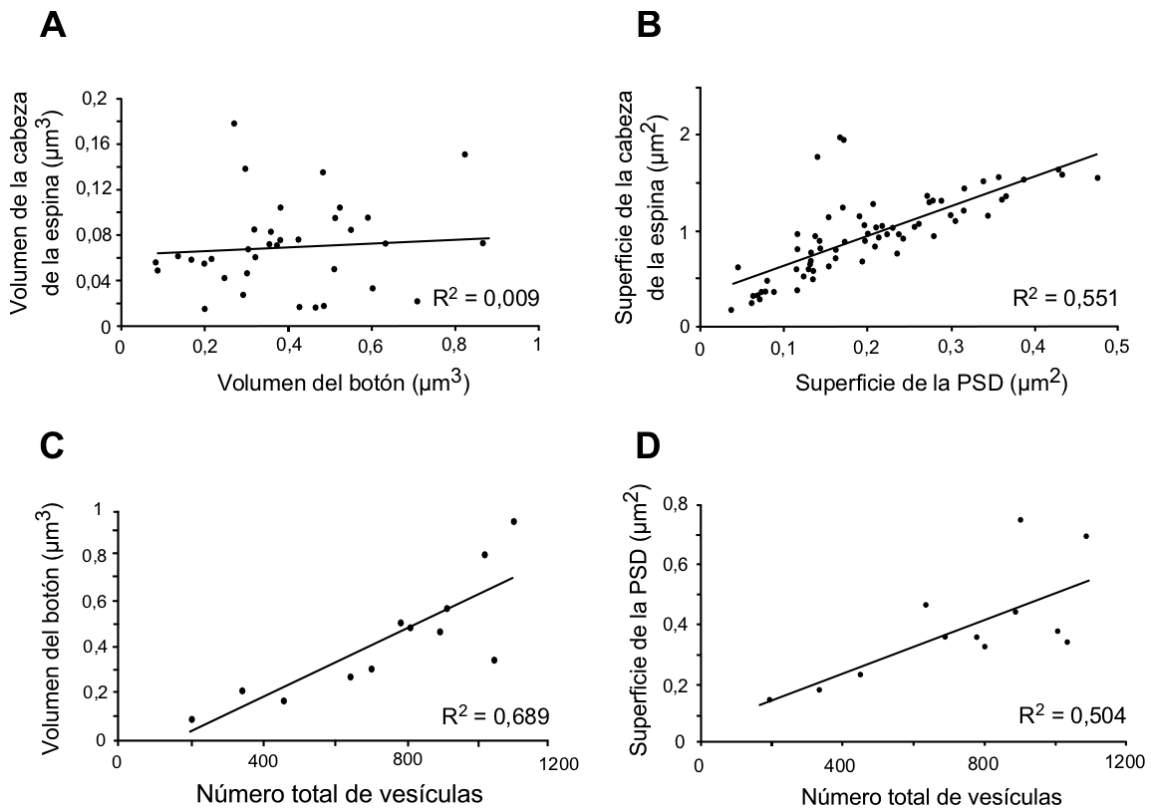
La mayoría de las mitocondrias localizadas en los botones sinápticos de VPMdm analizados (1-4 mitocondrias por botón) se encontraron ocupando toda la longitud del terminal y siempre rodeadas de vesículas sinápticas. El volumen medio mitocondrial fue  $0,99 \pm 0,06 \mu\text{m}^3$ , el cual representaba alrededor del 23% del volumen total del botón sináptico (Tabla 2). Además, el tamaño mitocondrial está muy correlacionado con el tamaño del botón ( $r = 0,728$ ;  $p\text{-valor} < 0,00001$ ) (Figura 28B). Por tanto, el tamaño y número de mitocondrias dentro del botón está relacionado con el tamaño del botón, sugiriendo así un rol importante de la mitocondria en la función del elemento presináptico.



**Figura 28. Correlaciones y distribución de diferentes parámetros estructurales de los botones procedentes de VPMdm I.** **A:** Análisis de correlación entre la superficie del botón vs. su volumen. Se observa una correlación muy alta indicada por la línea de regresión y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). **B:** Análisis de correlación entre el volumen del botón vs. el volumen mitocondrial. **C:** Análisis de correlación entre la superficie del botón vs. el área del contorno de la PSD. Ambos parámetros tienen una correlación muy baja. **D:** Histograma de barras de la distribución del área de la PSD en espinas dendríticas vs. segmentos dendríticos. No se observan diferencias significativas, por tanto, tienen una distribución similar ( $p = 0,876$ ; test Kolmogorov-Smirnov).



También, se ha medido el área del contorno de la PSD así como el área de su interfaz. La media de la superficie del contorno de la PSD fue  $0,21 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $0,03 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $0,47 \mu\text{m}^2$ ); y la media de la superficie de la interfaz de la PSD fue  $0,1 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  (Tabla 2). Además, se observó que el tamaño de la PSD se distribuía de forma similar tanto en espinas como en segmentos dendríticos. Sólo se ha encontrado una correlación muy débil entre el área de la PSD (como área total de todas las PSDs de un botón) con el área del botón sináptico ( $r = 0,207$ ;  $p\text{-valor} = 0,02$ ) (Figura 28C-D).



**Figura 29. Correlaciones entre diferentes parámetros estructurales de los botones procedentes de VPMdm II.** **A:** Análisis de correlación entre el volumen del botón vs. el volumen de la cabeza de la espina dendrítica. No se observa correlación, indicado por la línea de regresión y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). **B:** Análisis de correlación entre la superficie de la PSD vs. la superficie de la cabeza de la espina dendrítica. **C:** Análisis de correlación entre el número total de vesículas dentro de cada botón vs. el volumen del botón. Ambos parámetros tienen una correlación alta. **D:** Análisis de correlación entre el número total de vesículas dentro de cada botón vs. la superficie de la PSD.

Atendiendo al elemento postsináptico, se ha estimado el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas, obteniéndose una superficie media de  $0,87 \pm 0,47 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $0,17 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $1,98 \mu\text{m}^2$ ) y un volumen medio de  $0,06 \pm 0,04 \mu\text{m}^3$  (mínimo:  $0,004 \mu\text{m}^3$ ; máximo:  $0,18 \mu\text{m}^3$ ) (Tabla 2). El tamaño de la cabeza de la espina dendrítica no se

correlaciona con el tamaño del botón presináptico ( $r = 0,095$ ;  $p\text{-valor} = 0,37$ ) (Figura 29A). Sin embargo, el área de la PSD está altamente correlacionada con la superficie de la cabeza de la espina ( $r = 0,743$ ;  $p\text{-valor} > 0,00001$ ) (Figura 29B). Esto parece indicar una relación directa entre el tamaño de la cabeza de la espina con el tamaño de la PSD, pero no con el tamaño del terminal presináptico.

Las vesículas sinápticas localizadas en los botones sinápticos levemente marcados ( $N = 12$ ) se encontraron también ocupando toda la longitud del terminal. El número total medio de vesículas sinápticas dentro del botón fue  $740 \pm 285$  (mínimo: 200; máximo: 1095) (Tabla 2), estimado a través del método estereológico del Disector Físico (error máximo 5%). Por tanto, la densidad de vesículas sinápticas en los botones procedentes de VPMdm es de  $1717 \text{ vesículas}/\mu\text{m}^3$ . El número total de vesículas sinápticas estuvo muy correlacionado con el tamaño del botón ( $r = 0,830$ ;  $p\text{-valor} < 0,00033$ ) (Figura 29C). También se ha observado que el área de la PSD y el número total de vesículas sinápticas por botón estaban correlacionados ( $r = 0,71$ ;  $p\text{-valor} = 0,01$ ) (Figura 29D). Sin embargo, no se ha podido estimar la distancia de cada vesícula sináptica a la densidad presináptica, por tanto, no se ha podido determinar el número de vesículas pertenecientes al grupo que va a ser liberado con la llegada de un potencial de acción, así como el número de vesículas que componen el grupo de reciclaje y de reserva.

## **6.2. Análisis cuantitativo de parámetros estructurales correspondientes a la sinapsis de los botones marcados de Po**

Los botones sinápticos marcados correspondientes a los axones de las neuronas de proyección procedentes del núcleo Po talámico localizados en la capa 5a de S1BF variaron en forma y tamaño al igual que los botones analizados de VPMdm (Tabla 3). La media de su superficie fue  $2,69 \pm 1,15 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $0,86 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $6,84 \mu\text{m}^2$ ) con un volumen medio de  $0,24 \pm 0,13 \mu\text{m}^3$  (mínimo:  $0,03 \mu\text{m}^3$ ; máximo:  $0,80 \mu\text{m}^3$ ) (Tabla 3). Ambos valores estuvieron altamente correlacionados ( $r = 0,901$ ;  $p\text{-valor} < 0,00001$ ) (Figura 30A).

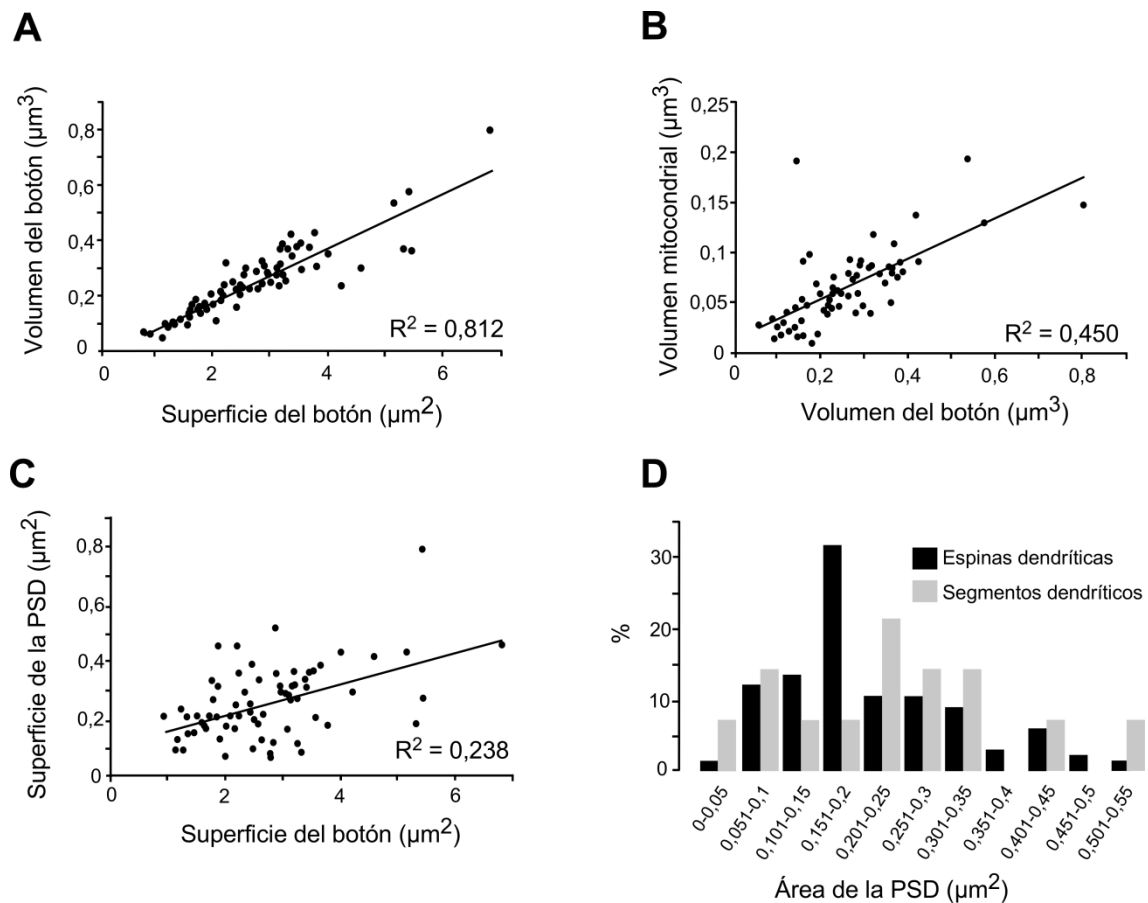
Tabla 3: Análisis cuantitativo de parámetros estructurales de la sinapsis identificada entre los botones de Po y sus elementos postsinápticos.

<b>BOTÓN</b>					
Nº de botones analizados	Botones multisinápticos/ Botones sin sinapsis	Sinapsis en espinas vs. segmentos dendríticos	Superficie del botón (µm²)	Volumen del botón (µm³)	Correlación superficie del botón vs. volumen
76	9,4% / 6,8%	82% vs. 18%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,03-0,80 0,24 ± 0,13 0,23 0,54	r = 0,901 p < 0,00001
<b>MITOCONDRIA</b>					
Nº de mitocondrias analizadas	% de botones con mitocondria	% de volumen mitocondrial en el volumen total del botón	Volumen mitocondrial (µm³)	Correlación volumen del botón vs. volumen mitocondrial	
65	87,8%	26,36%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,01-0,19 0,06 ± 0,04 0,06 0,60	r = 0,671 p < 0,00001
<b>VESÍCULAS SINÁPTICAS</b>					
Nº de botones con vesículas analizadas	Nº de vesículas por botón	Correlación nº de vesículas vs. volumen del botón	Correlación nº de vesículas vs. área de la PSD		
12	Rango Media ± SD Mediana CV	142-878 346 ± 211 300 0,61	r = 0,686 p = 0,014	r = 0,683 p = 0,014	
<b>PSD</b>					
Nº de PSDs analizadas	% de PSDs perforadas	Superficie de la interfaz de la PSD (µm²)	Área de la PSD (µm²)	Área de la PSD en segmentos dendríticos (µm²)	Correlación superficie del botón vs. área de la PSD
80	35%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,01-0,25 0,11 ± 0,06 0,10 0,52	0,03-0,51 0,21 ± 0,11 0,2 0,52	0,04-0,51 0,21 ± 0,11 0,19 0,51 r = 0,488 p = 0,00002
<b>ESPIÑA DENDRÍTICA</b>					
Nº de espinas analizadas	% de espinas con una sinapsis simétrica adicional	Superficie de la cabeza de la esquina (µm²)	Volumen de la cabeza de la esquina (µm³)	Correlación volumen del botón vs. volumen de la cabeza de la espina	Correlación área de la PSD vs. superficie de la cabeza de la espina
66	18%	Rango Media ± SD Mediana CV	0,28-1,87 0,89 ± 0,36 0,92 0,40	0,01-0,19 0,06 ± 0,03 0,05 0,60	r = 0,765 p < 0,00001

La media del área de proyección máxima calculada para los botones analizados en TEM ha sido de  $0,98 \pm 0,62 \mu\text{m}^2$ . Este dato es casi un 50% mayor comparado con el área de proyección máxima obtenida con el microscopio óptico con el objetivo de 1000x de las varicosidades reveladas con DAB-Niquel sulfato de los axones procedentes del Po en las secciones adyacentes analizadas de los mismos experimentos (ver apartado 1.2; Figura 16B). Aunque ambas observaciones son comparables, se debe tener en cuenta que la diferencia encontrada podría deberse a la calidad del marcado a nivel óptico, que presentaba un aspecto tenue a causa del procesamiento del tejido orientado hacia su análisis a nivel de microscopía electrónica.

La mayoría de los botones sinápticos de Po analizados presentaron una única mitocondria en su interior que ocupaba la mayor parte de la longitud total del terminal y siempre rodeada de vesículas sinápticas. El volumen medio mitocondrial fue  $0,06 \pm 0,04 \mu\text{m}^3$ , el cual representaba alrededor del 26% del volumen total del botón sináptico (Tabla 3). Además, el tamaño mitocondrial estuvo correlacionado con el tamaño del botón ( $r = 0,671$ ;  $p\text{-valor} < 0,00001$ ) (Figura 30B), aunque dicha correlación es menor que la calculada para los botones de VPMdm, ya que se ha observado algún botón con una mitocondria que ocupaba casi el 90% de su volumen.

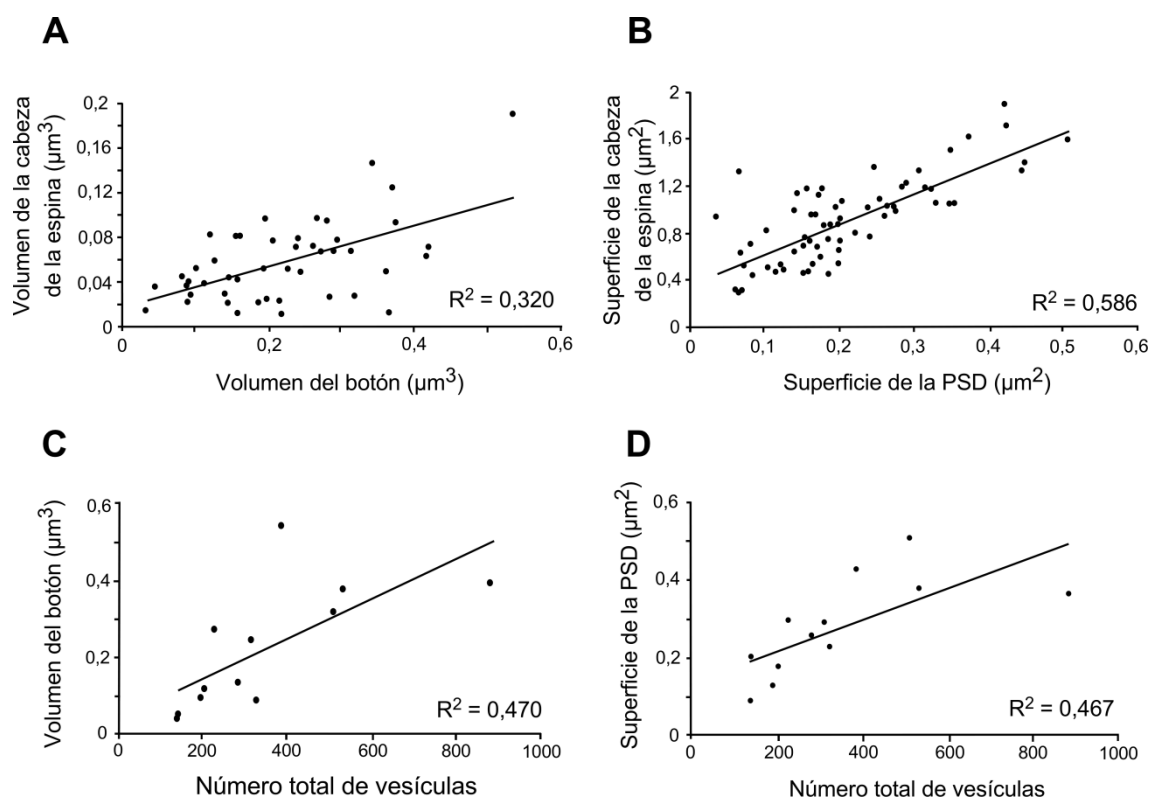
En cuanto al elemento postsináptico, la media de la superficie del contorno de la PSD fue  $0,21 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $0,03 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $0,51 \mu\text{m}^2$ ); también se ha calculado la superficie de aposición de la sinapsis, cuya media fue  $0,11 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$  (Tabla 3). Se observó una distribución similar del tamaño de la PSD en espinas y en segmentos dendríticos. Se ha encontrado una cierta correlación entre el área de la PSD (como área total de todas las PSDs de un botón) con el área del botón sináptico ( $r = 0,488$ ;  $p\text{-valor} = 0,00002$ ), la cual ha sido más alta que la encontrada para los botones de VPMdm (Figura 30C-D).



**Figura 30. Correlaciones y distribución de diferentes parámetros estructurales de los botones procedentes de Po I.** **A:** Análisis de correlación entre la superficie del botón vs. su volumen. Se observa una correlación muy alta indicada por la línea de regresión y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). **B:** Análisis de correlación entre el volumen del botón vs. el volumen mitocondrial. **C:** Análisis de correlación entre la superficie del botón vs. el área del contorno de la PSD. Ambos parámetros tienen una correlación mayor que la observada en el caso de VPMdm. **D:** Histograma de barras de la distribución del área de la PSD en espinas dendríticas vs. segmentos dendríticos. No se observan diferencias significativas, por tanto, tienen una distribución similar ( $p = 0,279$ ; test Kolmogorov-Smirnov).

Se ha estimado el tamaño de la cabeza de la espina dendrítica ya que los cuellos no se han podido reconstruir de forma completa. Se ha obtenido una superficie media de  $0,89 \pm 0,36 \mu\text{m}^2$  (mínimo:  $0,28 \mu\text{m}^2$ ; máximo:  $1,87 \mu\text{m}^2$ ) y un volumen medio de  $0,06 \pm 0,03 \mu\text{m}^3$  (mínimo:  $0,01 \mu\text{m}^3$ ; máximo:  $0,19 \mu\text{m}^3$ ) (Tabla 3). El tamaño de la cabeza de la espina dendrítica muestra una cierta correlación con el tamaño del botón presináptico ( $r = 0,566$ ;  $p$ -valor =  $0,00004$ ) (Figura 31A), al contrario de lo observado en botones procedentes del VPMdm. Además, el área de la PSD estuvo altamente correlacionada con la superficie de la cabeza de la espina ( $r = 0,765$ ;  $p$ -valor  $> 0,00001$ ) (Figura 31B). Esto parece indicar una relación directa entre el tamaño de la cabeza de la espina con el tamaño de la PSD, al igual que en el caso de las espinas dendríticas postsinápticas a los botones de VPMdm.

Se pudieron cuantificar las vesículas sinápticas localizadas dentro de los botones sinápticos analizados que presentaron un producto de reacción de DAB menos intenso. Las vesículas ocupaban toda la longitud del terminal. El número total medio de vesículas sinápticas dentro del botón fue  $346 \pm 211$  (mínimo: 142; máximo: 878) (Tabla 3). Por tanto, la densidad de vesículas sinápticas en los botones procedentes de Po es de 1448 vesículas/ $\mu\text{m}^3$ . El número total de vesículas sinápticas estuvo correlacionado con el tamaño del botón ( $r = 0,686$ ; p-valor = 0,014) (Figura 31C). También se ha observado que el área de la PSD y el número total de vesículas sinápticas por botón estaban correlacionados ( $r = 0,683$ ; p-valor = 0,014) (Figura 31D). Tampoco se ha podido estimar en este caso la distancia de cada vesícula sináptica a la densidad presináptica, por lo que no se ha podido definir cómo se agrupan las vesículas dentro del botón.



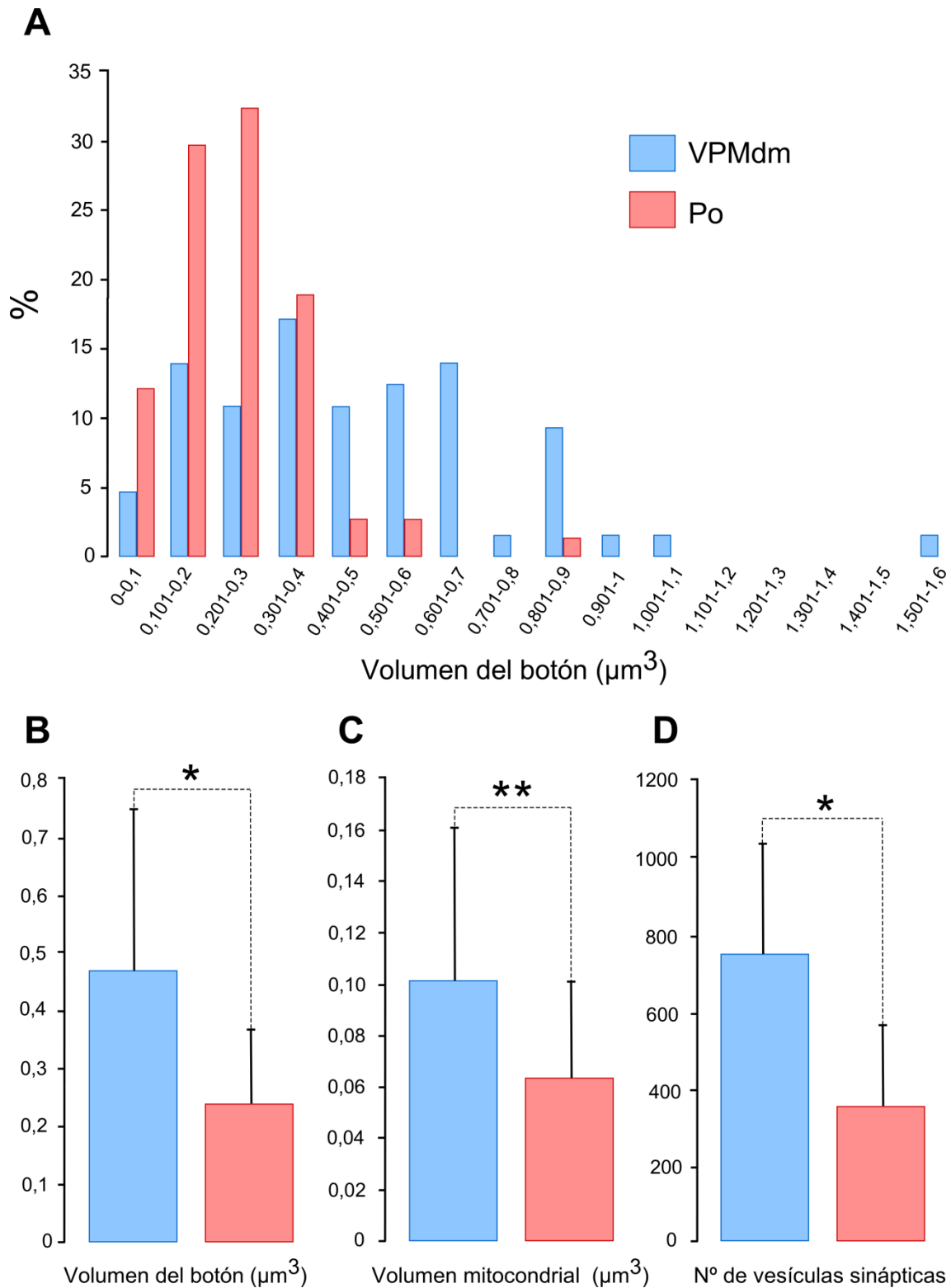
**Figura 31. Correlaciones entre diferentes parámetros estructurales de los botones procedentes de Po II.** **A:** Análisis de correlación entre el volumen del botón vs. el volumen de la cabeza de la espina dendrítica. Se observa una cierta correlación, indicado por la línea de regresión y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). **B:** Análisis de correlación entre la superficie de la PSD vs. la superficie de la cabeza de la espina dendrítica. **C:** Análisis de correlación entre el número total de vesículas dentro de cada botón vs. el volumen del botón. **D:** Análisis de correlación entre el número total de vesículas dentro de cada botón vs. la superficie de la PSD.

## 7. ANÁLISIS COMPARATIVO DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS TÁLAMO-CORTICAL. VPMdm VS. Po

Una vez analizados cuantitativamente diversos parámetros estructurales de la STC entre los axones procedentes de los núcleos talámicos (VPMdm y Po), implicados en la vía somatosensorial, que llevan información hasta S1BF, arborizando en capas corticales diferentes, con aspectos conectivos y funcionales diferentes: VPMdm como núcleo de primer orden que recibe su aferencia directriz de regiones subcorticales y cuya eferencia a los barriles de capa 4 también es de tipo directriz; y Po como núcleo de orden superior que recibe su aferencia directriz de parte de la corteza y cuya eferencia a capa 5a de S1BF es considerada de tipo modulador (Theyel y cols., 2010; Viaene y cols., 2011); nos planteamos comparar los resultados obtenidos para ver las diferencias estructurales entre estas dos vías paralelas de procesamiento de información somestésica.

Lo primero que se observó es que la distribución de tamaños de los botones sinápticos procedentes de ambos núcleos talámicos fue significativamente diferente (test de Komogorov-Smirnov;  $p\text{-valor} < 0,0005$ ), obteniéndose un mayor número de botones sinápticos procedentes de Po de menor tamaño (Figura 32A). Además el tamaño de los botones de VPMdm y Po fue también significativamente diferente (test de U de Mann-Whitney = 1057,5;  $p\text{-valor} < 0,05$ ) (Figura 32B).

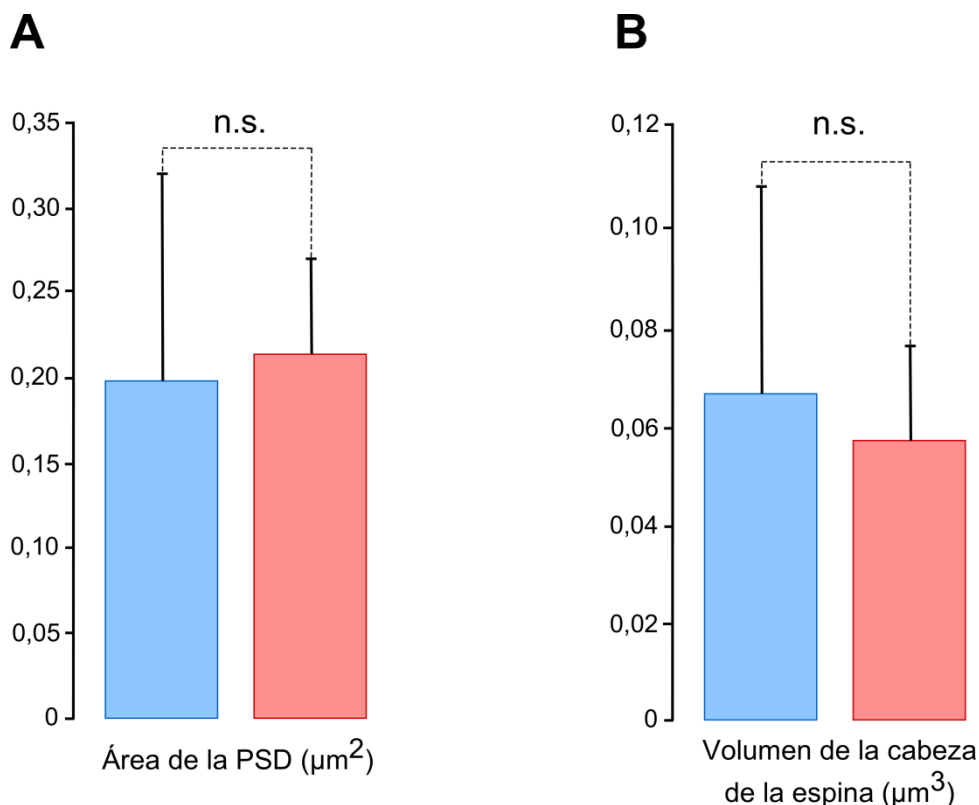
Observadas estas diferencias, se han comparado los elementos subcelulares del interior del botón (mitocondrias y vesículas sinápticas), y se obtuvieron también diferencias significativas, siendo menor el volumen mitocondrial en los botones de Po (U de Mann-Whitney = 1140;  $p\text{-valor} = 0,00042$ ) (Figura 32C), así como el número de vesículas sinápticas (U de Mann-Whitney = 21;  $p\text{-valor} < 0,05$ ) (Figura 32D). Por tanto, estos elementos serían los responsables del menor tamaño de los botones sinápticos de los axones procedentes de Po.



**Figura 32. Análisis comparativo de diferentes parámetros estructurales de los botones de VPMdm vs. Po.** **A:** Histograma de la distribución en intervalos de tamaño (volumen) de los botones procedentes de VPMdm vs. Po (K-S,  $p < 0,0005$ ). **B:** Histograma de las medias del volumen de los botones de VPMdm vs. Po (U de M-W,  $p < 0,05$ ). **C:** Histograma de las medias del volumen mitocondrial de los botones de VPMdm vs. Po (U de M-W,  $p < 0,001$ ). **D:** Histograma de las medias del número total de vesículas sinápticas en los botones de VPMdm vs. Po (U de M-W,  $p < 0,05$ ).



En cuanto al elemento postsináptico, se han comparado tanto los tamaños de las PSDs de las sinapsis que establecían ambos grupos de botones talámicos, como el tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas postsinápticas a dichos botones sinápticos. No se han encontrado diferencias significativas entre el tamaño medio de las PSDs (tanto de espinas dendríticas como de segmentos dendríticos) (U de Mann-Whitney = 3989; p-valor > 0,05) (Figura 33A), ni tampoco entre el volumen medio de las cabezas de las espinas dendríticas (U de Mann-Whitney = 2075; p-valor > 0,1) (Figura 33B).

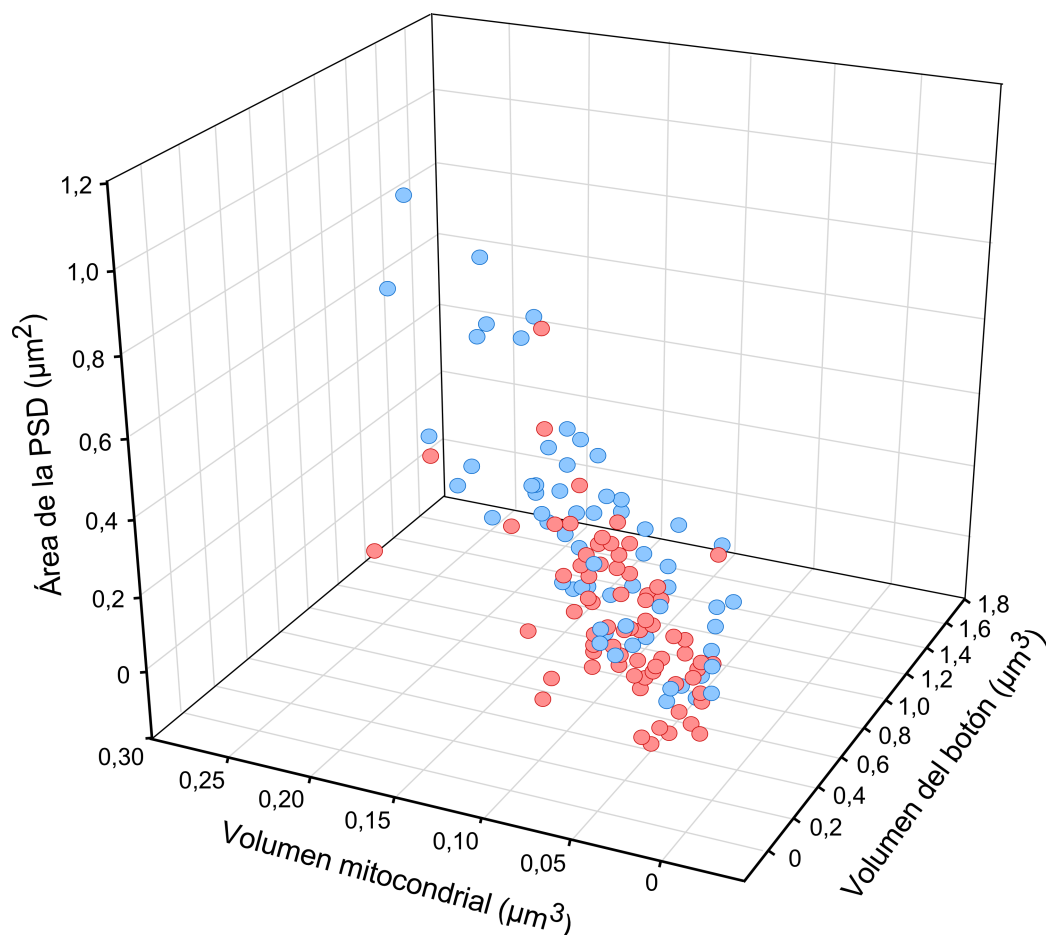


**Figura 33. Análisis comparativo de diferentes parámetros estructurales de los elementos postsinápticos a los botones de VPMdm (azul) vs. Po (rojo).** **A:** Histograma de las medias del área del contorno de la PSD de los botones de VPMdm vs. Po (U de M-W, p > 0,05). **B:** Histograma de las medias del volumen de las cabezas de las espinas dendríticas postsinápticas a los botones de VPMdm vs. Po (U de M-W, p > 0,1). n.s. = no significativo.

Por tanto, la comparación de las medias de los parámetros estructurales analizados sugiere que las diferencias entre la estructura de ambas STCs procedentes del VPMdm (núcleo de primer orden) y Po (núcleo de orden superior), radica en la estructura del elemento presináptico, sin embargo, la estructura del elemento postsináptico con el que establecen contacto sería similar, aún tratándose de neuronas postsinápticas diferentes en capas distintas (SSCs en capa 4 vs. neuronas piramidales de penacho simple en capa 5a), incluso

considerando el presumible contacto sináptico con interneuronas (segmentos dendríticos).

Teniendo en cuenta la comparación de los parámetros estructurales que componen la sinapsis de manera individual, se han apreciado diferencias significativas entre los botones sinápticos procedentes de VPMdm y de Po. Sin embargo, si se analizan de manera conjunta el volumen del botón, el volumen mitocondrial y el área de la PSD, se ha observado una distribución similar de ambos grupos de botones sinápticos, aunque se aprecia una ligera tendencia de agrupación de los botones de VPMdm en unas características estructurales “potenciadas”, mientras que los botones de Po mostraron una morfología correspondiente a una “menor potenciación” (Figura 34).

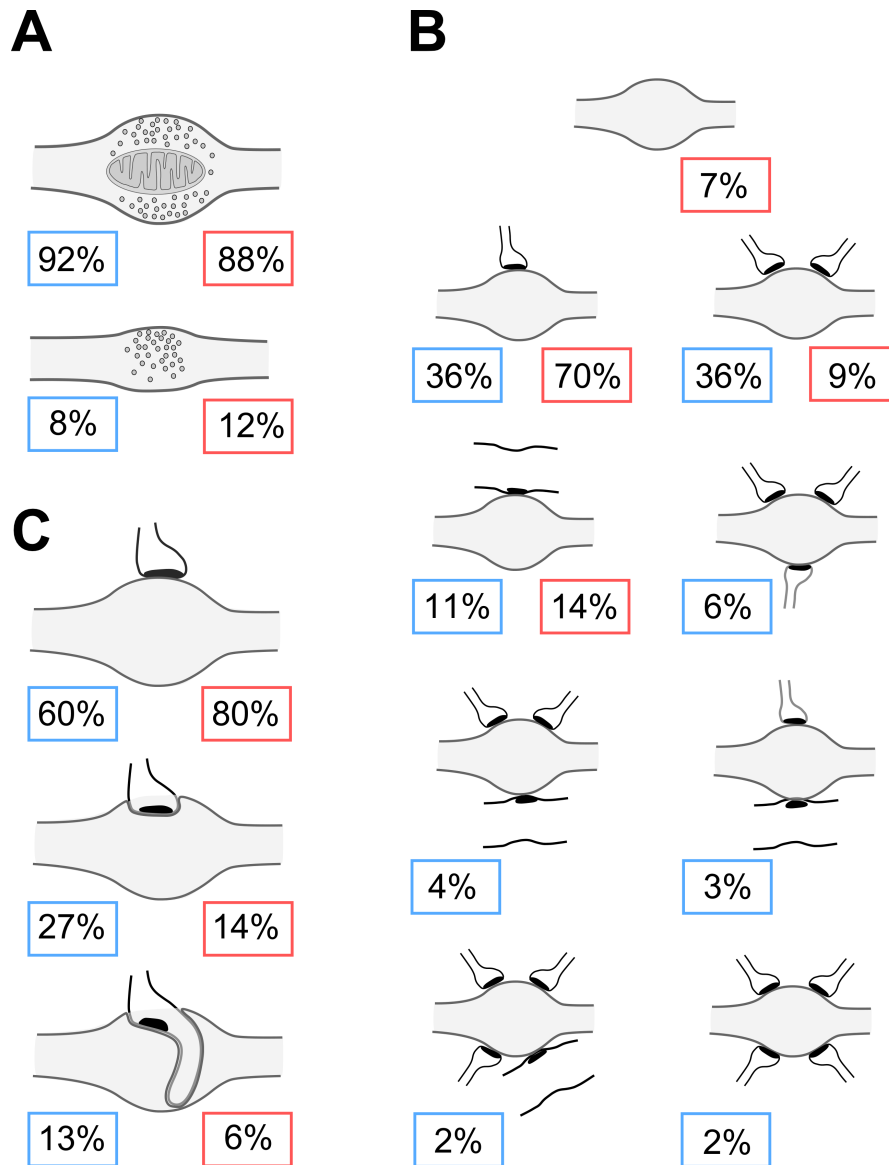


**Figura 34. Gráfico tridimensional comparativo de diferentes parámetros estructurales de la STC procedente de los núcleos VPMdm (azul) y Po (rojo).** Teniendo en cuenta el volumen del botón, el volumen mitocondrial y el área de la PSD de ambas poblaciones de botones, se observa una distribución similar, sin grupos diferenciados; aunque se aprecia un mayor número de botones de VPMdm en valores más altos y de botones de Po en valores más bajos.

También se han observado diferencias en la prevalencia de diversos fenotipos de botones y contactos sinápticos (Figura 35). El 92% de los botones de VPMdm analizados contenían al menos una mitocondria, y, dentro del 8% restante, tres de ellos (5%) fueron identificados como segmento no varicoso. Sin embargo, un 12% de los botones de Po analizados no contenían mitocondria, siendo solamente 1 de ellos un segmento no varicoso. Es probable que la falta de análisis con FIB/SEM de axones marcados procedentes de Po sea la causa de la subestimación de este fenotipo sináptico (1/9 “botones” sin mitocondria) (Figura 35A).

En cuanto a los contactos sinápticos, todos los botones sinápticos de VPMdm analizados establecían al menos una sinapsis. El 53% de ellos eran multisinápticos, observándose múltiples combinaciones: con dos espinas dendríticas (36%), con una espina y un segmento dendrítico (3%), con tres espinas dendríticas (6%), con dos espinas dendríticas y un segmento dendrítico (4%), incluso hasta cuatro contactos sinápticos diferentes (4%). Los botones sinápticos de Po analizados han resultado ser más “sencillos”, ya que sólo el 9% de ellos han resultado ser multisinápticos, observándose siempre el mismo fenotipo: dos sinapsis con dos espinas dendríticas diferentes. Además, se ha encontrado un 7% de botones procedentes de Po que no establecían ningún tipo de contacto sináptico, aún conteniendo en su interior vesículas sinápticas, y, en algunos casos, al menos una mitocondria (Figura 35B).

Además, se han observado diversas morfologías en los contactos sinápticos con espinas dendríticas (Figura 35C). En ambos casos, la mayor parte de las sinapsis se producían de una manera convencional mediante la aposición paralela de ambas zonas activas, siendo esta morfología más frecuente en los botones de Po (80%). En un menor porcentaje, la cabeza de la espina dendrítica se incluía parcialmente en el botón enfrentando una superficie cóncava frente a otra convexa, aumentándose así la superficie no sináptica de aposición. Además, se ha observado en algunos casos, una protrusión membranosa, procedente de la cabeza de la espina, insertándose en el botón sináptico. Esta especialización se ha observado con mayor prevalencia en los botones de VPMdm que en los de Po (13% vs. 6%)



**Figura 35. Resumen gráfico de la prevalencia de diversas características estructurales de los botones sinápticos de VPMdm (azul) y Po (rojo) y de sus patrones de invasión sobre sus elementos postsinápticos diana. A:** Botones sinápticos de ambos núcleos talámicos que contienen o no mitocondria. **B:** Predominancia de los patrones de invasión observados en ambos grupos de botones sinápticos. **C:** Diversas especializaciones sinápticas observadas en las espinas dendríticas postsinápticas a los botones procedentes de VPMdm y Po. De arriba abajo, aposición convencional entre un botón sináptico y una espina dendrítica que sólo incluye la zona activa; aumento de la superficie de aposición a causa de la invasión parcial de la cabeza de la espina dendrítica sobre el botón sináptico; gran aumento de la superficie de aposición por la aparición de una protrusión dendrítica insertada en el botón sináptico. Nótese que el perímetro del botón se mantiene constante mientras que la protrusión de la espina se expande.

## V. DISCUSIÓN

---



En el presente trabajo aportamos el primer análisis cuantitativo tridimensional y detallado de la ultraestructura de la STC de axones anterógradamente marcados por inyecciones poblacionales neuronales en los núcleos VPMdm y Po talámicos del ratón adulto, los cuales arborizan de manera focal en la capa 4 de S1BF y de manera extensa en la capa 5a de S1BF respectivamente. Usando microscopía electrónica de alta calidad y precisión, nuestros datos muestran unas características especiales correspondientes a los elementos pre- y postsinápticos, que juntas contribuyen a conformar las propiedades, tanto comunes como “únicas”, de las sinapsis que establecen en la corteza cerebral los axones de los distintos tipos de NTCs.

Los diferentes parámetros estructurales analizados en este estudio corresponden a las diferentes características funcionales que presenta la STC en diferentes capas corticales de una misma área inervada por distintas regiones de núcleos talámicos, los cuales vehículan diferente información correspondiente, en nuestro caso, a la información somestésica procedente de las vibrisas del ratón.

Además, nuestros datos muestran que aunque los botones sinápticos procedentes de los distintos núcleos analizados poseen algunas diferencias entre ellos, hay unas características comunes que les identifica como botones TCs, lo que impone una identidad funcional determinada mostrada por muchos estudios fisiológicos como una sinapsis altamente eficaz que es capaz de dirigir la respuesta de la corteza cerebral estableciendo una comunicación recíproca tálamo-corteza esencial para la integración y procesamiento del estímulo que proviene del exterior y modularlo a través de conexiones CCs, creándose así, flujos de información que se filtran y modulan hasta aportar la respuesta adecuada. Por tanto, es necesario que la STC tenga unas características tanto funcionales como estructurales específicas y diferentes a la sinapsis procedente de conexiones CCs, y a su vez, diversos núcleos talámicos deben desarrollar una función tanto directriz como moduladura dependiendo tanto del área cortical como de la información vehiculada desde regiones tanto corticales como subcorticales.

En la siguiente discusión, primero se examinará la importancia del estudio cuantitativo detallado de axones originados en NTCs identificadas tanto a nivel sináptico (escala “microscópica”) como a nivel de proyección (escala “mesoscópica”), así como las limitaciones técnicas que suponen los estudios de conectómica considerando ambos

niveles, como el presente estudio. Segundo, se compararán nuestros datos con estudios previos de microscopía electrónica sobre la estructura de la STC, haciendo hincapié sobre la posible diferencia entre las distintas proyecciones talámicas en distintas áreas corticales, así como con los datos disponibles sobre otras sinapsis glutamatérgicas presentes en el sistema nervioso. Finalmente, se considerará la posible relevancia funcional de los parámetros estructurales analizados en la sinapsis procedente del VPMdm y Po, así como las características observadas en los elementos postsinápticos con los que establecen contacto (espinas dendríticas y segmentos dendríticos).

# 1. RELEVANCIA Y LIMITACIONES TÉCNICAS DEL ANÁLISIS DE BOTONES SINÁPTICOS TÁLAMO-CORTICALES IDENTIFICADOS

Como se ha descrito ampliamente en la introducción, los TCAs conectan monosinápticamente el tálamo con todas las áreas de la corteza cerebral. Lejos de ser una población neuronal homogénea, las NTCs están reconocidas como un grupo diverso de NTPs glutamatérgicas con una amplia diversidad de arquitecturas axónicas (Clascá y cols., 2016). Los TCAs divergen, convergen y ramifican de forma extensa en su proyección a la corteza cerebral. Como resultado, toda área cortical recibe aferencias de varias vías TCs que se originan en diferentes núcleos o subnúcleos talámicos, llevando diversos tipos de información y estableciendo sus arborizaciones axónicas terminales con un patrón laminar diferente y, en muchos casos, solapándose en las distintas áreas de la corteza (revisado por Castro-Alamancos y Connors, 1997; Bosman y cols., 2011; Clascá y cols., 2016). Por ejemplo, en roedores, axones procedentes del VPMdm, los cuales constituyen la proyección “específica” o lemniscal, inervan topográficamente y focalmente la región de los barriles de capa 4 en S1. Sin embargo, los axones de la región “extralemniscal” ventrolateral del núcleo VPM inervan no sólo los barriles de capa 4 sino también, de manera más densa, los septa (Pierret y cols., 2000; Haidarlu y cols., 2008), mientras que otros axones inervan selectivamente los septa (Furuta y cols., 2009). Además, axones procedentes del “multi-específico” o “paralemniscal” núcleo Po inervan los septa de capa 4 pero arborizan densamente en la capa 5a, por debajo de los barriles, además de mandar axones que se extienden por la capa 1 (Lu y Lin, 1993; Ohno y cols., 2012). Este patrón de inervación de la capa 1 cortical también se observa en los axones



“no específicos” del núcleo VM y de los núcleos intralaminares como el parafascicular (Rubio-Garrido y cols., 2009), contribuyendo así a la innervación de S1.

A día de hoy, existe una hipótesis apoyada por diversos estudios, de que la STC procedente de diferentes núcleos talámicos podría ser estructuralmente diferente en términos de especializaciones del elemento presináptico así como del postsináptico involucrado en dicha sinapsis (da Costa y Martin, 2011; Viaene y cols., 2011; Familtsev y cols., 2016; Bopp y cols. 2017; Hsu y cols., 2017).

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, hemos diseñado un abordaje experimental que ha permitido la visualización selectiva de TCAs, para su análisis y comparación. Es decir, sólo axones procedentes de las neuronas “lemniscas” de VPMdm y axones “paralemniscas” de Po han sido marcados en este estudio. Para ello, se ha examinado cuidadosamente la extensión de las inyecciones del trazador anterógrado BDA en dichos núcleos talámicos, y se han descartado aquellos experimentos con depósitos que no se limitaran a estos núcleos en cuestión, y dentro de ellos, se han seleccionado las inyecciones que incluían una población de neuronas talámicas que proyectaban específicamente a S1BF, a la zona de macrovibras (ver Resultados; Figuras 13 y 15). Para una mayor consistencia, las muestras seleccionadas para su análisis en microscopía electrónica fueron tomadas de los mismos barriles de capa 4 en el caso de axones de VPMdm (barriles D7-8 y E7), y de capa 5a en el caso de axones de Po (barriles D7 y E6-7) (ver Materiales y Métodos; Figura 12).

La combinación del marcado axonal selectivo y el análisis cuantitativo tridimensional con microscopía electrónica de la STC es técnicamente difícil. Por eso, durante décadas, se han probado diversos diseños experimentales para su abordaje, esperando obtener un compromiso entre ambas aproximaciones que permitiera un análisis cualitativo de calidad y cuantitativamente robusto. El primer abordaje experimental fue la degeneración anterógrada de los axones terminales en corteza a través de una lesión talámica (Jones y Powell, 1970; Garey y Powell, 1971; Peters y cols., 1977; White, 1978; Davis y Sterling, 1979; White y Rock, 1979; Hersch y White, 1981), la cual, en principio, era bastante selectiva, ya que al microscopio electrónico los axones en degeneración específicos del núcleo talámico lesionado eran visibles e identificables con claridad. Sin embargo, debido a la desintegración de los segmentos interbotón y la distorsión producida en la estructura

de los botones sinápticos (White, 1986; Shanks y Powell, 1981), este método sólo permitía un análisis cualitativo pero imposibilitaba totalmente el análisis cuantitativo de los parámetros estructurales implicados en la sinapsis. El segundo abordaje experimental sería a través de inmunohistoquímica para vGLUT2, que se expresa en botones TCs, excluyendo así el marcado de botones CCs, por lo que hace posible el estudio de la estructura de la STC conservando los terminales intactos para su análisis y reconstrucción tridimensional (Kubota y cols., 2007; 2015; Bopp y cols., 2017). Sin embargo, este inmunomarcado “específico” no permitiría distinguir entre TCAs procedentes de distintos núcleos talámicos, los cuales convergen en una misma área cortical, y además, incluiría sinapsis no talámicas procedentes del claustró, cuyos terminales en corteza expresan vGLUT2 (Hur y Zaborski, 2005). El tercer abordaje experimental sería a través de trazadores axonales anterógrados tales como lectinas (Cipolloni y cols., 1985; Keller y cols., 1985; Lu y Lin, 1993), biocitina (Lev y cols., 2002) o BDA (White y cols., 2004; da Costa y Martín, 2009; Anderson y cols., 2009; este estudio), inyectados en localizaciones talámicas específicas. Este método tiene la ventaja de preservar intacta la estructura del axón (Reiner y cols., 2000), ya que su ultraestructura aparece cualitativamente similar a los axones que no han sido iontoforetizados, obteniéndose datos cuantitativos de parámetros estructurales dentro de los rangos descritos en análisis ultraestructurales de tejido sin ningún tipo de marcado axonal (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016), o similares a los obtenidos utilizando inmunomarcado del tejido ya fijado en la misma región de interés que la del presente estudio (Bopp y cols., 2017); además, permite un análisis paralelo con microscopía óptica. Por tanto, el BDA es un trazador particularmente adecuado por su alta sensibilidad y su proceso de inyección por iontoferesis relativamente sencillo, el cual minimiza el daño tisular (Reiner y cols., 2000).

Sin embargo, la especificidad de este último abordaje experimental reside en una alta precisión del depósito del trazador (ver Figuras 13 y 15). En el caso del estudio a nivel ultraestructural de la STC, este método presenta una posible desventaja debido a las conexiones recíprocas presentes entre el tálamo y la corteza, es decir, debido a un cierto componente retrógrado en los trazadores anterógrados, se han observado neuronas cortico-talámicas marcadas retrógradamente en capa 6 de S1BF en el caso de las inyecciones en VPMdm, y en capa 5b de S1BF en el caso de las inyecciones en Po, las cuales proyectan colaterales axónicas a capa 4 y capa 5a, respectivamente (Feldmeyer, 2012; Qi y Feldmeyer, 2015), donde se encuentra el marcado anterógrado TC. En el

presente estudio, se ha intentado limitar esta posibilidad usando micropipetas para la inyección con puntas de diámetro interno muy pequeño (6-10  $\mu\text{m}$ ), utilizando además corrientes muy bajas para la iontoforesis del trazador (700-800 nA), y se ha utilizado el trazador BDA de 10000K, el cual se transporta fundamentalmente en dirección anterógrada (Reiner y cols., 2000). Como resultado de este procedimiento experimental, el marcado observado en todos los experimentos ha sido fundamentalmente de tipo anterógrado, apareciendo algún soma aislado marcado retrógradamente en la corteza. Además, más del 80% de los botones sinápticos analizados en este trabajo establecían contacto sináptico con espinas dendríticas, lo cual es consistente con un marcado selectivo de TCAs, ya que las colaterales axónicas procedentes de capa 6 y 5b, predominantemente establecen sinapsis con segmentos dendríticos (White y Keller, 1987; Qi y Feldmeyer, 2015). Por último, dichos botones, en general, tenían un tamaño superior al tamaño de los botones de las colaterales axónicas de las neuronas cortico-talámicas en roedores, el cual, se ha descrito que es uniformemente pequeño (White y Keller, 1987; Kubota y cols., 2007). Aún así, no podemos descartar con toda seguridad la posibilidad de que alguno de los botones sinápticos analizados en este estudio pertenezcan a dichas colaterales axónicas intracorticales.

Aparte de las ventajas expuestas anteriormente, el método estándar utilizado para revelar el BDA en experimentos de trazado de conexiones a nivel de microscopía óptica, podría enmascarar los elementos subcelulares claves en el interior del botón, como la densidad presináptica, las mitocondrias, o las vesículas sinápticas, a causa del denso precipitado que produce. Por tanto, en los experimentos presentados en esta tesis, se ha modificado dicho procedimiento para adquirir un compromiso entre la detección de manera fiable, a nivel de microscopía electrónica, de botones sinápticos TCs marcados, a lo largo de toda su extensión en los sucesivos cortes ultrafinos en los que se extiende, pero a su vez, suficientemente claro para permitir la identificación de dichos elementos (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). El protocolo de revelado de BDA utilizado sólo ha imposibilitado la reconstrucción, en todos los botones sinápticos analizados, de la densidad presináptica y de la obtención de la distancia de las vesículas sinápticas a ella, lo que hubiera permitido distinguir y agrupar las vesículas en los distintos grupos: RRP, de reciclaje y de reserva; lo cual es posible en otros abordajes experimentales del estudio de la ultraestructura de la sinapsis que no realizan marcado de los terminales presinápticos (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016).

Las reconstrucciones tridimensionales a partir de microfotografías de microscopía electrónica de grandes volúmenes de tejido y el análisis cuantitativo de elementos pre- y postsinápticos identificados para un determinado tipo de sinapsis ha sido hasta hace poco extremadamente laborioso. Por esta razón, apenas hay datos en la literatura correspondientes a un análisis detallado ultraestructural y tridimensional de la sinapsis de la mayor parte de regiones del sistema nervioso. Ya que para ello, se requiere la obtención de largas y continuas series de imágenes, alineadas y de gran resolución, a partir de secciones ultrafinas ( $\leq 60$  nm), de regiones específicas (Bosch y cols. 2016). Los recientes avances tecnológicos en el campo de la microscopía electrónica, tales como el ATUM-SEM (Denk y Horstman, 2004) y el FIB/SEM (Knott y cols., 2008), han mejorado en los últimos años la capacidad de producir grandes bloques de imágenes seriadas de microscopía electrónica correspondientes a un gran volumen de tejido, antes sólo posible con el corte seriado ultrafino manual con ultramicrotomo, para obtener series de imágenes con TEM. Además, todo este desarrollo tecnológico ha sido acompañado por la generación de programas informáticos, tales como OpenCAR (Sätzler y cols., 2002) y ESPINA (Morales y cols., 2011), que permiten analizar estos grandes volúmenes de imágenes y además permiten la realización de reconstrucciones tridimensionales y la obtención de datos cuantitativos del neuropilo seleccionado. En el presente estudio hemos utilizado un procedimiento clásico de corte seriado en ultramicrotomo (60 nm) y posterior análisis con TEM, combinado, en el caso de los axones marcados procedentes de VPMdm, con FIB/SEM. Además, se han utilizado ambos programas informáticos para el análisis de datos (OpenCAR para las imágenes obtenidas con TEM; ESPINA para las imágenes obtenidas con FIB/SEM), ya que ambos producen unos datos consistentes y comparables entre sí. El análisis de cortes seriados con TEM tiene la ventaja de una mayor resolución de imagen que ha permitido un análisis más detallado de los elementos subcelulares implicados en la sinapsis, tales como la reconstrucción y estimación del número de vesículas sinápticas, sin embargo, es un procedimiento más laborioso cuyas muestras son de menor volumen que las obtenidas con FIB/SEM. El análisis con FIB/SEM, por tanto, tiene la ventaja de permitir el análisis de grandes volúmenes de tejido con una frecuencia de corte mayor (20 nm), lo que permite una reconstrucción tridimensional detallada de estructuras con morfologías, en ocasiones complejas, como las PSDs o las espinas dendríticas (Figura 26).

## 2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CON ESTUDIOS PREVIOS SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS ELEMENTOS DE LA SINAPSIS

En general, nuestras observaciones son consistentes con lo descrito cualitativamente en la literatura por estudios sobre la ultraestructura de la STC procedente del VPMdm y Po en la S1BF, realizados en rata y ratón y cuyos resultados se basan en un análisis sobre cortes seriados pero sin reconstrucción tridimensional de la morfología de los elementos implicados. Dichos estudios observaron que los botones procedentes de VPMdm eran relativamente grandes, con mitocondrias en su interior, y, de manera frecuente, establecían más de una sinapsis con elementos postsinápticos distintos y, además, estos tenían PSDs complejas (Benshalom y White, 1986; Lu y Lin, 1993; Kharazia y Weinberg, 1994; White y cols., 2004). Además, en el estudio llevado a cabo por White y colaboradores (2004) en la capa 4 de ratón adulto, aparecían reconstruidos, a partir de secciones seriadas, seis segmentos axónicos varicosos marcados por grandes inyecciones de BDA en VPM. Aunque este estudio no analizó cuantitativamente dichos segmentos, ni los elementos postsinápticos con los que establecían contacto, sí aportó las observaciones cualitativas descritas anteriormente, y además un dato importante, gracias a la reconstrucción de segmentos, la aparición de sinapsis “fuera” de botón. Sin embargo, los botones sinápticos procedentes del Po no han sido apenas estudiados. El único estudio de referencia que ha analizado, sólo cualitativamente, la ultraestructura de estos botones mediante inyección de trazador en los núcleos VPM y Po de rata, ha sido el realizado por Lu y Lin (1993); los cuales describieron que los botones del Po eran similares a los del VPM, y que la mayor parte de ellos también, al igual que los de VPM, establecían contactos sinápticos con espinas dendríticas, por lo que concluyeron que las diferencias entre ambas proyecciones radicaba en su patrón laminar de arborización en la región de S1BF, más que en la microestructura de la sinapsis.

Otro estudio de referencia, más reciente, para el presente trabajo es el llevado a cabo por Bopp y colaboradores (2017) mediante inmunohistoquímica de vGLUT2 para marcar “en masa” todas las sinapsis talámicas y, además, las procedentes del claustró, en la capa 4 de S1 y de M1 del ratón adulto, proveyendo también datos cuantitativos sobre reconstrucciones tridimensionales de algunos parámetros estructurales. Sin embargo, no queda claro en este estudio si todos los datos corresponden a los botones sinápticos de los

axones procedentes únicamente del VPMdm, porque además de los botones vGLUT2 positivos procedentes del claustró (Clascá y cols., 1992; Hur y Zaborski, 2005), podrían estar incluyendo botones sinápticos procedentes de otros núcleos talámicos que inervan también la capa 4 de S1 y que pueden ser estructuralmente diferentes (Chomsung y cols., 2010; Viane y cols., 2011; da Costa y Martin, 2011; Familtsev y cols., 2016). Por tanto, los datos recogidos en este estudio pueden ser similares a los datos recogidos en el presente trabajo, sin embargo, las diferencias encontradas podrían deberse a la inclusión en el trabajo de Bopp y cols. (2017) de botones del claustró y de otras regiones del VPM, así como del núcleo Po, sin la posibilidad de poder hacer distinción entre ellos, ya que todos son vGLUT2 positivos.

Nuestras observaciones cualitativas, en general, están en consonancia con lo ya descrito por otros estudios anteriores. Sin embargo, los datos cuantitativos de los parámetros estructurales analizados en el presente estudio difieren sustancialmente. Estas diferencias podrían deberse a los distintos métodos utilizados en otros trabajos para la obtención de datos cuantitativos, y a la gran precisión de nuestros métodos de medida y reconstrucción tridimensional; sin embargo, es muy posible, que la mayor parte de las diferencias encontradas se deban al hecho de que hemos examinado exclusivamente sinapsis formadas por axones talámicos bien identificados, de núcleos concretos, en lugar de sinapsis mezcladas tanto por marcado inespecífico para este objetivo (Chomsung y cols., 2010; Familtsev y cols., 2015; Bopp y cols., 2017), como por ausencia de marcado (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016; Hsu y cols., 2017).

### **2.1. Tamaño del Botón y Número de Sinapsis**

A día de hoy, ningún estudio ha abordado de manera sistemática y detallada el tamaño (superficie y volumen) de los botones sinápticos de TCAs identificados, procedentes de núcleos talámicos determinados, en la S1BF de roedor, incluso en otras áreas corticales o especies animales. Estudios clásicos con inyecciones de trazadores anterógrados en núcleos talámicos de fenotipo “específico” cuyos axones proyectan de forma focal a la capa 4 de áreas sensoriales primarias, hicieron observaciones y mediciones a partir de cortes ultrafinos únicos determinando que los botones talámicos tenían una superficie mayor que otros botones presentes en el neuropilo (CCs) (Lu y Lin, 1993; Kharazia y

Weinberg, 1994; White y cols. 2004; Lev y cols., 2002; Anderson y cols., 2009; da Costa y Martin, 2009).

A nivel de microscopía óptica, se puede obtener el área de proyección máxima de los botones. En el presente trabajo, para el caso de los botones de VPMdm, se ha obtenido una media de  $1,83 \mu\text{m}^2$  ( $N = 400$  botones dibujados a cámara clara con el objetivo de 100X). Sin embargo, con un número mayor de botones ( $N = 1500$ ) se ha obtenido una media menor ( $1,3 \mu\text{m}^2$ ) (Porrero, 2016). La media del área de proyección máxima calculada para los 76 botones analizados (con TEM y FIB/SEM) ha sido  $1,12 \mu\text{m}^2$ . Esta medida es un 40% más pequeña que la obtenida, a nivel óptico, en este trabajo, sin embargo, es muy similar a la obtenida en el análisis de una población muy numerosa de botones (Porrero, 2016). En el caso de Po se ha obtenido una media de  $0,5 \mu\text{m}^2$  ( $N = 400$  botones dibujados a cámara clara con el objetivo de 100X); mientras que con un número mayor de botones ( $N = 1500$ ) se ha obtenido una media mayor ( $1,01 \mu\text{m}^2$ ) (Porrero, 2016). La media del área de proyección máxima calculada para los botones de Po analizados en capa 5a de S1BF con TEM, ha sido  $0,98 \mu\text{m}^2$ . Esta medida es casi un 50% más grande que la obtenida a nivel óptico, posiblemente debido a que el marcado presentaba un aspecto tenue y poco definido, ya que el revelado de los axones para nuestro estudio estaba enfocado al análisis en TEM. Sin embargo, la media de la proyección máxima medida a nivel ultraestructural, ha sido similar a la obtenida por Porrero (2016), a nivel óptico, en una población muy numerosa de botones.

Por tanto, la estimación del tamaño de las varicosidades en estudios con microscopía óptica, es similar al tamaño obtenido con microscopía electrónica, siempre y cuando se analice una población suficientemente grande de botones y así reducir lo más posible el error cometido al dibujar el contorno de la varicosidad, el cual se encuentra en el límite de la resolución óptica.

El estudio publicado por Bopp (2017), basado en corte seriado y reconstrucciones 3D, que ha determinado el tamaño de los botones sinápticos, presumiblemente talámicos, mediante inmunomarcado con vGLUT2 en la capa 4 de S1BF, ha obviado el análisis de botones sinápticos marcados en otras capas corticales dentro de la misma región, como la capa 5a (Bopp y cols., 2017). Nuestros datos han mostrado un volumen del botón significativamente mayor (media  $0,47 \mu\text{m}^3$ ) que el tamaño determinado por Bopp y colaboradores en capa 4 de S1BF (media  $0,31 \mu\text{m}^3$ ). Esta diferencia probablemente sea debido al análisis de botones sinápticos vGLUT2 positivos, los cuales proceden tanto del tálamo (concretamente del VPMdm) como del claustró. Además, este volumen



determinado específicamente para los botones de VPMdm en los barriles de capa 4 ha sido mayor también al de los botones sinápticos vGLUT2 positivos en la capa 4 de M1 (media  $0,17 \mu\text{m}^3$ ; Bopp y cols., 2017), y a los botones vGLUT2 negativos, presumiblemente no talámicos, en ambas regiones corticales (media  $0,07 \mu\text{m}^3$ ; Bopp y cols., 2017). Sin embargo, para los botones de capa 5a procedentes de Po (media  $0,24 \mu\text{m}^3$ ), significativamente menores, ha resultado ser similar a lo observado en capa 5 de la corteza visual primaria de gato en cuanto a los botones sinápticos de los axones tipo W (Anderson y cols., 2009). El tamaño aportado por Bopp y cols. para capa 4 de M1 probablemente comprenda botones procedentes Po, ya que sus axones proyectan a capas intermedias en esta región cortical (Ohno y cols., 2012); sin embargo, a nivel de microscopía óptica se ha observado en experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, que los botones de Po en corteza motora son significativamente mayores que los botones de Po en S1 (Porrero, 2016), lo cual no correspondería con lo observado por Bopp. Estos mismo experimentos han determinado, a nivel de microscopía óptica, que los botones de capa 4 en S1BF procedentes de VPMdm son mayores que los botones de capa 5a procedentes de Po (Porrero, 2016). Nuestros datos ultraestructurales confirman este hecho.

Además, otros estudios que han analizado el tamaño del botón en diferentes regiones corticales pero sin identificar su procedencia, es decir, realizando un análisis masivo de botones TCs y CCs, han determinado unos volúmenes medios significativamente menores, probablemente debido al análisis de una población mezclada de ambos tipos de botones sinápticos ( $0,2 \mu\text{m}^3$  en capa 4 de S1 de rata, Rollenhagen y cols., 2015;  $0,1 \mu\text{m}^3$  en capa 2/3 de V1 y corteza frontal de ratón, Hsu y cols., 2017).

Hemos observado que más de la mitad de los botones sinápticos procedentes de VPMdm son multisinápticos (rango 1-4 sinapsis; ratio 1,6 sinapsis/botón), mientras que sólo un pequeño porcentaje ( $\sim 9\%$ ) de botones de Po son multisinápticos (rango 1-2 sinapsis; ratio 1,05 sinapsis/botón). Sin embargo, estudios previos en capa 4 de S1BF de ratón adulto han observado una menor proporción de botones multisinápticos (25%, White y cols., 2004; 20%, Bopp y cols., 2017); aunque han confirmado una mayor prevalencia de botones multisinápticos en capa 4 de S1BF comparado con otras capas y regiones corticales, lo que sería consistente con nuestras observaciones.



También hemos observado un porcentaje de sinapsis localizadas en segmentos axónicos no varicosos (diámetro  $< 0,5 \mu\text{m}$ ) en ambos casos (2,4% de las sinapsis de VPMdm; 9,6% de las sinapsis de Po). Ambas proporciones son menores que la observada en TCAs en capa 4 de S1 por White y cols. (2004) (12%). Dada la pequeña longitud total de axón analizada en ambos estudios, es probable que la diferencia no sea significativa, y que además se esté subestimando la proporción de sinapsis en segmentos no varicosos. En cualquier caso, la confirmación de la existencia, en ambas poblaciones de TCAs, de sinapsis “fuera de botón” debe tomarse en cuenta al realizar estudios a nivel de microscopía óptica.

## 2.2. Vesículas sinápticas

Sólo hemos estimado el número de vesículas sinápticas en los botones sinápticos correspondientes a imágenes seriadas obtenidas con TEM. Sin embargo, sólo los casos donde el marcado con BDA no comprometía la identificación de casi la totalidad de las vesículas sinápticas se examinaron ( $N = 12$  en ambos grupos de botones TCs). A pesar de la pequeña muestra considerada, se han obtenido diferencias significativas entre las medias del número total de vesículas por botón (Figura 32D). El número total medio de vesículas fue mayor en los botones de VPMdm que en los de Po (740 y 346 respectivamente). Este resultado estaría en consonancia con el fenotipo funcional directriz de los axones procedentes de VPMdm frente al fenotipo modulador de los axones de Po en capa 5a de S1BF, lo cual estaría correlacionado con el tamaño del botón (Figura 29C y 31C) (Petrof y Sherman, 2013). Sin embargo, el número de vesículas sinápticas en los botones de VPMdm es mayor a lo observado por otros autores en la capa 4 de rata, estimado en una muestra mayor de botones pero sin identificar su origen (media 500 vesículas/botón; Dufour y cols., 2016); pero menor a lo observado en botones del hipocampo ( $\sim 1000$  vesículas/botón), donde se ha confirmado además, una reducción en el número de vesículas sinápticas después de producirse LTP (Bourne y cols., 2013).

El estudio de Bopp y cols. (2017) también estimó el número de vesículas sinápticas en los botones vGLUT2 positivos en capa 4, obteniendo un número medio muy alto (1623 vesículas/botón); sin embargo, esta estimación fue llevada a cabo por conteo de vesículas y corrección de sobrestimación por el método de Abercrombie, siendo el método estereológico del disector físico utilizado en el presente trabajo mucho más preciso (Nava

y cols., 2014). Por tanto, dichas diferencias probablemente sean debidas a la distinta metodología usada.

Las diferencias encontradas entre los botones de VPMdm y Po podrían ser extensivas también a los distintos subgrupos de vesículas (RRP, reciclaje y reserva), ya que un mayor número total de vesículas, podría determinar un mayor número en cada uno de los grupos (Rollenhagen y cols., 2015). Sin embargo, en hipocampo se ha observado que, tras LTP, el número de vesículas sinápticas RRP disminuye a los 30 minutos, y continua con una reducción en los dos grupos restantes a las dos horas (Bourne y cols., 2013). Por tanto, sería necesario profundizar en el mecanismo dinámico de los grupos de vesículas para poder determinar las causas y las diferencias observadas entre ambos grupos de botones sinápticos.

### **2.3.El papel de la mitocondria**

Aproximadamente el 90% de los botones sinápticos analizados de ambas poblaciones de TCAs contenían al menos una mitocondria, localizadas en toda la extensión del botón, contribuyendo un cuarto del volumen total. Estos valores son similares a lo observado en botones sinápticos en S1 de roedores (Bopp y cols., 2017; Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016). Estudios anteriores ya pusieron de manifiesto la presencia de múltiples mitocondrias, algunas de ellas de gran tamaño, en botones TCs (Kharazia y Weinberg, 1994; White y cols., 2004; da Costa y Martin, 2009).

Sin embargo, nuestros resultados muestran diferencias significativas entre los volúmenes medios mitocondriales en ambas poblaciones de botones talámicos; esto es consistente con las diferencias encontradas entre los tamaños del botón y el número total de vesículas sinápticas por botón, aunque cabe destacar, la aparición, en algunos botones sinápticos procedentes de Po de menor tamaño, de mitocondrias con un tamaño muy grande (ver Figura 30B).

Estos datos estructurales están en consonancia con el papel funcional desempeñado por la mitocondria como elemento localizado en los botones sinápticos, ya que la mitocondria no solamente intervendría en la producción de energía, sino también, como almacén interno de iones de calcio (Pozzan y cols., 2000; Rizzuto y cols., 2000), y por tanto,

estaría involucrada en la regulación de los niveles de calcio en el terminal sináptico (Perkins y cols., 2010). Se ha confirmado que las mitocondrias son orgánulos muy móviles dentro de las neuronas, produciéndose un desplazamiento de las mismas hacia los botones sinápticos donde habría un alto requerimiento tanto energético como de iones calcio (Mironov, 2006; Mironov y Symonchuk, 2006). Además, recientemente, diversos estudios han propuesto un nuevo papel para las mitocondrias en el fenómeno de la sinapsis: la movilización de vesículas sinápticas desde el grupo de reserva hasta el RRP (Verstreken y cols., 2005; Perkins y cols., 2010; Smith y cols., 2016).

Por todas estas razones expuestas, la aparición, en casi la totalidad de los botones sinápticos analizados, de mitocondrias, sugiere una capacidad de prevenir la rápida disminución de vesículas del RRP, así como contribuir al fenotipo funcional potenciado y eficaz de la STC; fenómeno que no estaría presente en las sinapsis observadas en segmentos no varicosos, ya que no tienen mitocondrias asociadas, lo que probablemente determina la ausencia de una morfología de tipo botón.

#### **2.4. Tamaño y morfología de la PSD**

Uno de los parámetros estructurales directamente relacionado con la transmisión y la plasticidad sináptica es el tamaño de las zonas activas, incluyendo la PSD, así como las diferentes morfológicas que presenta (revisado por Südhof, 2012). Aunque nuestros datos muestran una considerable variabilidad del tamaño de la PSD (tanto del área total del contorno como el área de la interfaz) en ambos grupos de STCs analizadas, no se han encontrado diferencias significativas entre ellos (Figura 33A). Sin embargo, estas tienen un tamaño mayor que la media de las sinapsis excitadoras obtenida en diversas áreas de la corteza de roedor (Kuroda y cols., 2007; Dufour y cols., 2016; Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017), pero se ajustan dentro del rango obtenido para sinapsis excitadoras corticales (0,01-0,33  $\mu\text{m}^2$ ; Arellano y cols., 2007).

La comparación del tamaño de la PSD con estudios previos es, en cierta manera, complicada, ya que se utiliza indistintamente el área del contorno de la PSD (Rollenhagen y cols., 2015; Dufour y cols., 2016) y el área de la interfaz (Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017) para determinar el área de la PSD. Sin embargo, para ambos parámetros hemos obtenido valores superiores a los observados por estos estudios.

No obstante, nuestros datos sobre el tamaño de las PSDs en el caso de sinapsis formadas por los axones de VPMdm son similares a las PSDs descritas para los botones de la vía “específica” de los axones X e Y geniculocorticales en el área visual primaria de gato (da Costa y Martin, 2009), donde además se observó una alta proporción de sinapsis perforadas similar a la proporción en las sinapsis de los axones de VPMdm, lo cual no se corresponde con lo observado para otras áreas corticales del ratón como V1 y corteza frontal donde se ha observado una menor prevalencia de sinapsis perforadas (Hsu y cols., 2017). Además, el tamaño de las PSDs en el caso de Po también ha sido similar a lo observado en las sinapsis formadas en la capa 5 de V1 de gato por los axones talámicos W (Anderson y cols., 2009), sin embargo, este estudio observó también una alta proporción de sinapsis perforadas, mientras que el porcentaje de PSDs perforadas para la sinapsis procedente de Po ha sido algo menor (35%). Estos experimentos llevados a cabo en la corteza visual de gato observaron diferencias significativas entre los tamaños de las PSDs en las sinapsis formadas por los axones X/Y y por los W (Anderson y cols., 2009; da Costa y Martin, 2009), sin embargo, nuestros datos no han mostrado diferencias en el tamaño de la PSD entre las sinapsis formadas por un núcleo talámico “específico” en capa 4 (VPMdm) y otro “multiespecífico” en capa 5a (Po).

Todo lo expuesto anteriormente, sugiere una implicación de la morfología de la PSD (no perforada vs. perforada) en aspectos funcionales de la sinapsis, más que el propio tamaño que ha sido similar en ambas sinapsis, las formadas por axones de tipo directriz correspondientes a VPMdm y las formadas por axones de tipo modulador correspondientes a Po. Aunque existen evidencias de que ambas características (tamaño y forma) están correlacionadas con la potenciación y la eficacia sináptica (Geinisman y cols., 1991; 1993; Holtmaat y Svoboda, 2009). Además, como también muestran nuestros resultados, el número de vesículas sinápticas está correlacionado con el tamaño de la PSD (Figuras 29D y 31D), y, recientemente, otros autores han observado que el número de vesículas ancladas en la zona activa presináptica, así como el número de vesículas sinápticas de reserva, es mayor en sinapsis perforadas que en no perforadas (Nava y cols., 2014). Por tanto, la relación entre el tamaño relativamente grande y la morfología perforada de la PSD junto con un gran número de vesículas sinápticas del terminal presináptico podrían ser determinantes para una mayor eficacia sináptica.

## **2.5.Elementos postsinápticos a los axones de VPMdm y Po: espinas vs. segmentos dendríticos**

Todos los estudios previos sobre la STC, independientemente del núcleo talámico y la proyección analizada, así como de la especie animal estudiada, han determinado un mayor porcentaje de espinas dendríticas como elementos postsinápticos a los TCAs frente a segmentos dendríticos (Cunningham y Levay, 1986; Lu y Lin, 1993; Kharazia y Weinberg, 1994; Staiger y cols., 1996; White y cols., 2004; Anderson, 2009; da Costa y Martin, 2009; Smith y cols., 2012; Familtsev y cols., 2015; Bopp y cols., 2017). Concretamente, en la capa 4 de S1BF de ratón adulto, el porcentaje es aproximadamente un 80% (White y cols., 2004), similar a nuestros datos, que muestran que un 83% de las sinapsis formadas por los axones de VPMdm, y un 82% de las sinapsis formadas por los axones de Po, se localizan en cabezas de espinas. La mayor parte de estas espinas dendríticas han presentado una morfología de tipo “champiñón” con cuellos considerablemente largos. Este tipo morfológico se ha relacionado con sinapsis más “estables” y potenciadas, aumentándose el número de las mismas en fenómenos de LTP (Bourne y Harris, 2007). Además, nuestros datos confirman una correlación entre el tamaño de la cabeza de la espina y el área de la PSD (Figura 29B y 31B), como ya han mostrado multitud de estudios previos sobre sinapsis asimétricas en diversas áreas corticales de roedor (Harris y cols., 1992; Schikorski y Stevens, 1999; Arellano y cols., 2007; Rollenhagen y cols., 2015; Bopp y cols., 2017; Hsu y cols., 2017).

Además, aproximadamente la mitad de las espinas dendríticas analizadas postsinápticas a los botones de VPMdm tenían aparato de la espina, mientras que sólo el 27% de ellas presentaban dicha estructura en el caso de Po. También se han observado altos porcentajes de espinas con aparato de la espina en las capa 4 y 5 en la S1BF de rata adulta (Rollenhagen y cols., 2015). El aparato de la espina es una especialización subcelular implicada en la movilidad de las espinas dendríticas y en los procesos de LTP y LTD (Konur y Yuste, 2004; Holtmaat y cols., 2005; Umeda y cols., 2005), por lo que nuestra observación sugiere una mayor potenciación sináptica en el caso de los botones de VPMdm.

Un dato interesante que hemos observado es que en ambos casos, alrededor de un 15% de las espinas dendríticas analizadas, establecían una segunda sinapsis asimétrica

(inhibidora), frecuentemente localizada en la cabeza de la espina. Esta proporción también ha sido encontrada en espinas dendríticas postsinápticas a botones vGLUT2 positivos en la corteza frontal medial de la rata (Kubota y cols., 2007). Una posible explicación funcional de la innervación GABAérgica de estas espinas podría ser la de filtrar la gran excitación talámica de neuronas corticales a través de esta inhibición local en la propia columna cortical (Kubota y cols., 2007).

No obstante, hemos observado alrededor de un 20% de los botones sinápticos talámicos estableciendo contacto con segmentos dendríticos, presumiblemente pertenecientes a interneuronas locales. Staiger y colaboradores (1996) observaron que los botones sinápticos procedentes de VPM establecían contacto sináptico con interneuronas PV positivas (consideradas de disparo rápido) en la capa 4 de S1BF en rata con una proporción de un 8%, pero con una alta eficacia sináptica. Incluso, observaron una cierta convergencia de botones talámicos innervando este tipo de interneuronas, sugiriendo un importante papel de neuronas inhibitorias en las primeras fases del procesamiento de la información. Estudios posteriores confirmaron que estas interneuronas diana de TCAs serían las células en cesta, las cuales están implicadas en una rápida y eficiente inhibición disináptica evocada por estimulación talámica (Porter y cols., 2001; Swadlow, 2003; Beierlein y cols., 2003; Gabernet y cols., 2005; Cruikshank y cols., 2007; Staiger y cols., 2009).

Nuestros datos también confirman la existencia de un porcentaje similar de botones sinápticos procedentes de Po estableciendo sinapsis con interneuronas putativas en capa 5a. Sin embargo, la identidad de estas neuronas inhibitorias, a día de hoy no está clara. Algunos autores han propuesto que los axones procedentes de Po activarían, únicamente de forma transitoria, interneuronas PV positivas, y de una forma persistente y robusta activarían a las somatostatina positivas (Tan y cols., 2008; revisado por Naka y Adesnik, 2016). Sin embargo, un estudio reciente realizado *in vitro* ha mostrado una fuerte innervación de las interneuronas PV positivas por parte de Po, similar a la innervación desde VPM en la capa 4, mientras que la innervación de interneuronas somatostatina positivas y de las que expresan el receptor 5HT3a, sería mínima o inexistente (Audette y cols., 2017).

## **2.6. Protrusiones de las espinas dendríticas**

Gracias a las reconstrucciones 3D de alta resolución, hemos observado en un porcentaje, considerablemente más alto en sinapsis de VPMdm, de cabezas de espinas dendríticas parcialmente envueltas por la membrana del botón presináptico, formándose así una región extra-sináptica de aposición entre ambos elementos. Esta característica morfológica ya había sido observada en estudios previos de TCAs (White y cols., 2004), e incluso en axones CCs en la corteza visual de mono (Anderson y cols., 1999; Anderson y Martin, 2002). Esta morfología especial, debida a una aparición de curvaturas en las membranas pre- y postsinápticas, podría tener implicaciones funcionales relacionadas con la mayor probabilidad de liberación de neurotransmisor, y por tanto, mayor eficacia sináptica (Marrone y Petit, 2002); incluso se ha demostrado un aumento de esta morfología sináptica (espinas dendríticas cóncavas) deprivando a S1BF del estímulo sensorial periférico, aunque no especialmente en capa 4 (Machín y cols., 2006).

Además, un 13% de las espinas postsinápticas a los botones analizados de VPMdm, y un 6% de las espinas postsinápticas a los botones de Po, han presentado una gruesa protrusión emergiendo de la cabeza de la espina e incluyéndose en el botón sináptico. En estas espinas, la PSD estuvo localizada en la región de la cabeza o en la base de la protrusión, por lo que en todos los casos, la membrana de la protrusión fue no sináptica. Por tanto, estas protrusiones crean una extensa región únicamente de aposición, muy íntima, donde no se han observado procesos gliales entre las membranas. Estas protrusiones no han sido observadas previamente en la corteza de roedores. Sin embargo, se han observado morfologías similares en los botones sinápticos TCs en la corteza visual de hurón y tupaya (Erisir y Deusicke, 2005; Familtsev y cols., 2016). Los axones geniculocorticales que inervan la capa 4 de V1, de la misma forma que los de VPMdm, son de fenotipo “específico” (Clascá y cols., 2016), por lo que podríamos relacionar estas especializaciones postsinápticas con la sinapsis eficaz procedente de los núcleos de primer orden talámicos. Sin embargo, aunque en menor porcentaje, también hemos observado protrusiones en el caso de los TCAs de Po, aunque dichas protrusiones no se han descrito, por ejemplo, en las sinapsis de los botones procedentes del núcleo pulvinar talámico en tupaya, el cual es considerado un núcleo de orden superior como el Po (Familtsev y cols., 2016). Por tanto, los núcleos de “orden superior”, cuyas proyecciones



tendrían una función moduladora en cortezas primarias, no presentarían frecuentemente estas especializaciones.

El significado funcional de estas protrusiones, a día de hoy, sólo puede ser especulativa. Sin embargo, parece obvio que el aumento de superficie de aposición no sináptica incrementa el área disponible para el intercambio de señales peri-sinápticas, así como de interacciones tróficas, todo ello, libre de la interferencia glial existente en otras zonas (Perea y cols., 2009).

### 3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES DE LA SINAPSIS DE LOS NÚCLEOS VPMdm Y Po

Como se ha expuesto en la introducción, la diversidad de fenotipos de neuronas talámicas, así como de sus arquitecturas axónicas, podría explicar diferentes aspectos observados a nivel funcional, como la activación sincrónica de extensas regiones corticales. Sin embargo, varios tipos de neuronas talámicas también proyectan a una misma región cortical con un patrón laminar distinto y además, con una morfología ultraestructural significativamente diferente. Por lo que las características estructurales, tanto similares como diferentes, en el elemento pre- y postsináptico de la STC podrían ser claves para la aparición de una sinapsis eficaz y potente, o por el contrario, una sinapsis más moduladora.

Se ha comprobado que, en la región de S1BF, se produce una adaptación rápida de la respuesta a consecuencia de estimulación repetitiva de las vibrisas del animal a frecuencias superiores a 5 Hz (Chung y cols., 2002; Martin-Cortecero y Núñez, 2014). Además, la corteza regula la entrada sensorial talámica mediante proyecciones córtico-talámicas procedentes de la capa 6, incluso suprime su actividad a través del núcleo reticular talámico, todo ello dependiente de la frecuencia de estimulación. Sin embargo, durante una actividad de alta frecuencia cortical, la excitación talámica se incrementa por una facilitación producida por la aferencia cortical (Crandall y cols., 2015). Recientemente, se ha observado un efecto de potenciación en la capa 5a mediada por endocannabinoides liberados por el elemento postsináptico, que en último término

disminuirían la inhibición, potenciándose así la STC sin afectar la estructura del terminal presináptico (Maglio y cols., 2017).

La corteza somatosensorial de roedores integra la información somestésica obtenida por la proyección talámica para posteriormente desarrollar comportamientos complejos como la localización de objetos o la discriminación de texturas (Petersen, 2007; Feldmeyer y cols., 2013). Esta integración resulta de conexiones CCs, por ejemplo entre SSCs en la capa 4, las cuales son mayores en cuanto a número de sinapsis que las procedentes de VPM. Estas SSCs proyectan a su vez a las capas 5a, 6 y 2/3; además, esta última, conecta con la capa 5b. Las capas 5b y 6 proyectan muy densamente al núcleo Po talámico, siendo por tanto su aferencia directriz; y a su vez, la aferencia más densa desde Po es a la capa 5a, produciéndose así, un flujo cortico-tálamo-cortical (Feldmeyer y cols., 1999; Lübke y cols., 2000; Veinante y cols., 2000; Bureau y cols., 2006; Petreanu y cols., 2009). Estas proyecciones TCs tan específicas, se piensa que vienen predeterminadas por programas moleculares intrínsecos de las propias células, ya que se ha visto, por ejemplo, que en el ratón *reeler* (ratón mutante deficiente para relina cuya corteza cerebral está totalmente desorganizada), los axones procedentes de VPM conectan correctamente con las SSCs, aunque estas no muestran la organización típica de barriles de capa 4 (Wagener y cols., 2016). Aún así, la entrada procedente del tálamo aparece debilitada y su patrón conectivo mucho más disperso dentro del árbol dendrítico de las neuronas corticales, haciéndose necesario, por tanto, una amplificación intracortical mayor que compense este déficit (Guy y cols., 2016).

Sin embargo, en este escenario cortical, también es necesaria la inclusión de las interneuronas. Las más estudiadas han sido las de disparo rápido (PV positivas) encargadas de la inhibición por antealimentación de las células excitadoras de capa 4, a causa de la sinapsis talámica que reciben desde VPM (Staiger y cols., 1996; Porter y cols., 2001; Gabernet y cols., 2005; Sun y cols., 2006; Cruikshank y cols., 2007); existiendo además una inhibición por retroalimentación debido a conexiones recíprocas entre estas interneuronas y las SSCs de capa 4 (Cruikshank y cols., 2007). Además, existen algunas evidencias de que este patrón conectivo entre las neuronas talámicas y las interneuronas corticales es similar en la capa 5a, la cual recibe la aferencia desde Po (Audette y cols., 2017). Estos efectos inhibitorios paralelos podrían estar estableciendo

una pequeña ventana temporal para la integración de la información procedente del tálamo (Bruno y Sakmann, 2006; Wang y cols., 2010).

Debido a la clasificación del tálamo en núcleos de primer orden y de orden superior, dependiendo del origen de la aferencia directriz que reciben (subcortical o cortical respectivamente), se podría extrapolar al carácter funcional y estructural de su aferencia a las eferencias talámicas hacia la corteza, es decir, los TCAs podrían ser directrices o moduladores en su diana cortical. Por tanto, un botón sináptico TC se podría considerar directriz si presenta un tamaño relativamente grande, un número alto de sinapsis, una alta probabilidad de liberación del neurotransmisor, una adaptación rápida a estímulos de altas frecuencias y además, si produce una respuesta rápida mediada por receptores ionotrópicos (revisado por Bickford, 2016). Por tanto, los botones sinápticos de VPMdm se ajustarían a estas características, por lo que la proyección desde VPMdm a la capa 4 de S1BF sería de tipo directriz. Mientras que un botón sináptico TC de tipo modulador presenta un tamaño pequeño, un número bajo de sinapsis, una baja probabilidad de liberación del neurotransmisor, y produce una respuesta de baja amplitud que incrementaría con la estimulación repetida (revisado por Bickford, 2016). Por tanto, los botones sinápticos de Po se ajustarían a estas características, siendo su proyección a la capa 5a de S1BF de tipo modulador. Sin embargo, las NTCs de Po son de carácter multiespecífico, por lo que podría ser que los terminales procedentes de Po en otras áreas inervadas por este núcleo (como M1 o S2) no fueran necesariamente de tipo modulador, pudiendo presentar un fenotipo más directriz. Por tanto, debemos orientar futuros experimentos a analizar la ultraestructura de estos axones multiespecíficos para determinar su morfología en otras áreas corticales.

Otra consideración importante es la distribución de los terminales presinápticos en la neurona postsináptica. Teniendo en cuenta la clasificación descrita por Sherman y Guillery (2006; 2011), para el relevo talámico, de aferencias directrices y moduladoras, se ha descrito que los botones considerados ‘driver’ establecerían sinapsis con la neurona postsináptica en regiones proximales al soma, mientras que los botones considerados moduladores lo harían en zonas más distales de las dendritas. Dicha segregación correspondería también a la distribución diferencial de receptores, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, en las dendritas (Liu y cols., 1998; Sherman y Guillery 2006; 2011). Si volvemos a extrapolar esta clasificación a los botones TCs, como se ha descrito

anteriormente, los terminales procedentes de VPMdm estarían estableciendo contactos sinápticos en las regiones proximales al soma de las SSCs de la capa 4 de S1BF, mientras que los botones CCs estarían modulando esta estimulación tan potente procedente del tálamo a través de sinapsis en las zonas dendríticas más distales. Aunque esta hipótesis no podría ser confirmada con nuestros datos, el trabajo de Bopp y colaboradores (2017) ha descrito que no hay diferencias significativas en la morfología y tamaño de las sinapsis entre botones vGLUT2 positivos (TCs) y los vGLUT2 negativos (CCs) en S1 y M1, por lo que la segregación espacial de estos dos tipos de terminales junto con la activación sincrónica de las STCs y la amplificación derivada de los circuitos intracorticales, serían necesarias para producir una respuesta de tipo directriz.

Todas estas consideraciones ponen de manifiesto que, a día de hoy, no puede hacerse una interpretación funcional completa de la interacción entre el tálamo y la corteza, debido a la ausencia de un modelo conectómico completo (Markram, 2006). Para ello, es necesario combinar los resultados funcionales con la estructura específica de cada conexión, ya que, por ejemplo, en el presente trabajo, hemos encontrado diferencias entre las proyecciones de dos núcleos talámicos distintos a la misma área cortical. Además, los estudios conectómicos deberían también asociarse con estados conductuales determinados.



## VI. CONCLUSIONES

---



1. Las sinapsis establecidas por los axones procedentes de los núcleos VPMdm y Po talámicos son en aproximadamente un 80% con espinas dendríticas (presumiblemente células corticales excitadoras) frente a un 20% con segmentos dendríticos (presumiblemente células corticales inhibitorias).
2. Los botones sinápticos de los axones de VPMdm tiene un tamaño significativamente mayor (media  $0,46 \mu\text{m}^3$ ) que los botones sinápticos de los axones de Po (media  $0,24 \mu\text{m}^3$ ).
3. Un 92% de los botones sinápticos de los axones de VPMdm contienen al menos una mitocondria, las cuales tienen un tamaño medio de  $0,99 \mu\text{m}^3$  y representan un 23% del volumen del botón. Un 88% de los botones sinápticos de los axones de Po contienen al menos una mitocondria, las cuales tiene un tamaño significativamente menor que las de los botones de VPMdm ( $0,06 \mu\text{m}^3$ ) y representan un 26% del volumen del botón.
4. El número medio de vesículas sinápticas contenidas en el interior de los botones de VPMdm es significativamente mayor que el número medio de vesículas sinápticas en los botones de Po (740 vs. 346).
5. El tamaño de los botones sinápticos tálamo-corticales procedentes de los núcleos VPMdm y Po está correlacionado con el volumen mitocondrial y con el número de vesículas sinápticas.
6. El ratio de sinapsis por botón de los axones procedentes de VPMdm en la capa 4 de S1BF es 1,6 frente a un ratio de 1,05 de sinapsis por botón en los axones procedentes de Po en la capa 5a. Esta diferencia es debida a una mayor proporción de botones multisinápticos (hasta 4 sinapsis por botón) en los axones de VPMdm frente a 2 sinapsis como máximo en los botones procedentes de Po.
7. Los botones sinápticos de los axones de VPMdm establecen contacto sináptico en la capa 4 de S1BF en un 36% con una espina dendrítica, un 36% con dos espinas, un 11% con un segmento dendrítico, un 6% con tres espinas dendríticas, 4% con dos espinas y un segmento, un 3% con una espina y un segmento dendrítico y un 4% con cuatro perfiles postsinápticos. Los botones sinápticos de los axones de Po establecen contacto sináptico en la capa 5a de S1BF en un 70% con una espina dendrítica, un 9% con dos espinas dendríticas y un 14% con un segmento dendrítico. Además, un 7% de ellos no establecían ningún contacto sináptico.



8. El área media de la PSD de las sinapsis formadas por los axones de las NTCs de ambos núcleos talámicos es de  $0,21 \mu\text{m}^2$ , y el área media de la interfaz de la PSD es de  $0,1 \mu\text{m}^2$ . Además, la distribución de tamaños de la PSD es similar tanto en sinapsis establecidas con espinas dendríticas como con segmentos dendríticos.
9. El área de la PSD está correlacionada con la superficie de la cabeza de la espina, pero muestra una baja correlación con la superficie del botón sináptico. Sin embargo, el área de la PSD muestra una alta correlación con el número de vesículas sinápticas contenidas en el botón presináptico.
10. Las espinas dendríticas postsinápticas a los axones procedentes de los núcleos VPMdm y Po muestran diversas morfologías (champiñón, filopodio, gruesa, ramificada), con una mayor prevalencia de las espinas de tipo champiñón. El volumen medio de las cabezas de espinas es  $0,06 \mu\text{m}^3$ , el cual muestra una baja correlación con el volumen del botón presináptico. Además, un pequeño porcentaje de espinas dendríticas (15-18%) muestran una sinapsis simétrica adicional, con un elemento no marcado, localizada en la cabeza.
11. Un 60% de las espinas dendríticas postsinápticas a los botones de VPMdm presentan una zona de aposición sináptica paralela, frente a un 80% en el caso de Po. Un 27% de las cabezas de las espinas están parcialmente incluidas en la convexidad formada por la membrana de aposición presináptica en el caso de VPMdm frente a un 14% en el caso de Po. Un 13% de las espinas postsinápticas a los botones de VPMdm muestran una protrusión originada en la cabeza que aparece incluida en el botón, frente a un 6% de espinas con protrusión dendrítica en el caso de Po.
12. Un 5% de las sinapsis establecidas entre los axones procedentes de VPMdm en la capa 4 de S1BF se localizaron en segmentos axónicos no varicosos, frente a un 1,3% de las sinapsis establecidas entre los axones de Po en la capa 5a de S1BF que se localizaron en segmentos no varicosos.
13. El área de proyección máxima de los botones sinápticos de VPMdm medida a nivel de microscopía electrónica es un 40% más pequeña que la estimada a nivel óptico. El área de proyección máxima de los botones de Po medida a nivel de microscopía electrónica es un 50% más pequeña que la estimada a nivel óptico.
14. Los botones sinápticos de los axones de tipo “específico” (VPMdm) tiene un tamaño, un volumen mitocondrial y un número de vesículas sinápticas mayor que los botones de los axones de tipo “multiespecífico” (Po). Los elementos postsinápticos con los que establecen contacto estos botones no muestran

diferencias significativas en cuanto al área de la PSD y al tamaño de la cabeza de la espina dendrítica.

15. La distribución de los botones sinápticos procedentes de ambos núcleos talámicos (VPMdm y Po), en las capas 4 y 5a respectivamente de S1BF, es similar, atendiendo al tamaño del botón, volumen mitocondrial y área de la PSD.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**ABC:** Complejo avidina-biotina

**Am:** Amígdala

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**AP:** Anteroposterior

**ATUM-SEM:** Microscopio electrónico de barrido de corte seriado automático

**B:** Bregma

**BDA:** Aminodextrano biotinilado

**bt:** Botón

**Cb:** Calbindina

**CC:** Córtico-cortical

**Cr:** Calretinina

**CV:** Coeficiente de variación

**DAB:** 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorehídrico

**DCl<sub>a</sub>:** Claustro dorsal

**de:** dendrita

**dLGN:** Núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo

**Ent:** Corteza entorrinal

**EPSP:** Potencial postsináptico excitador

**FIB:** Haz de iones focalizado

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GFP:** Proteína fluorescente verde

**K-S:** Kolmogorov-Smirnov

**LD:** Núcleo laterodorsal del tálamo

**LIPS:** Sistema proyectante a capa 1

**LPL:** Núcleo posterolateral porción lateral

**LPM:** Núcleo posterolateral porción medial

**LTD:** Depresión a largo plazo

**LTP:** Potenciación a largo plazo

**M1:** Corteza motora primaria

**M-W:** Mann-Whitney

**MD:** Núcleo mediodorsal del tálamo

**MGN:** Núcleo geniculado medial del tálamo

**N:** Tamaño muestral

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NTC:** Neurona de proyección tálamo-cortical

**NTP:** Neurona talámica de proyección

**PB:** Tampón fosfato

**PFA:** Paraformaldehído

**PHA-L:** Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

**Po:** Núcleo posterior del tálamo

**PrV:** Núcleo principal del trigémino

**PSD:** Densidad postsináptica

<b>PV:</b> Parvoalbúmina	<b>V1:</b> Corteza visual primaria
<b>r:</b> Coeficiente de correlación de Pearson	<b>vGLUT2:</b> Transportador de glutamato tipo 2
<b>R<sup>2</sup>:</b> Coeficiente de determinación	<b>VL:</b> Núcleo ventral lateral del tálamo
<b>RPtN:</b> Núcleo reticular del tálamo	<b>VM:</b> Núcleo ventromedial del tálamo
<b>RRP:</b> Vesículas sinápticas preparadas para liberarse	<b>VP:</b> Núcleo ventral posterior del tálamo
<b>S1:</b> Corteza somatosensorial primaria	<b>VPL:</b> Núcleo ventral posterolateral del tálamo
<b>S2:</b> Corteza somatosensorial secundaria	<b>VPM:</b> Núcleo ventral posteromedial del tálamo
<b>S1BF:</b> Corteza de barriles de la corteza somatosensorial primaria	<b>VPMdm:</b> Núcleo ventral posteromedial del tálamo porción dorsomedial
<b>SD:</b> Desviación estándar	<b>VPMh:</b> Núcleo ventral posteromedial del tálamo región marginal de la porción dorsomedial
<b>SEM:</b> Microscopio electrónico de barrido	<b>VPMvl:</b> Núcleo ventral posteromedial del tálamo porción ventrolateral
<b>sp:</b> Espina dendrítica	<b>WGA-HRP:</b> Aglutinina de germen de trigo conjugada con perox
<b>SpV:</b> Núcleo espinal del trigémino	
<b>SpVc:</b> Núcleo espinal del trigémino porción caudal	
<b>SpVi:</b> Núcleo espinal del trigémino porción interpolar	
<b>SpVo:</b> Núcleo espinal del trigémino porción oral	
<b>SSC:</b> Células estrelladas espinosas	
<b>STC:</b> Sinapsis tálamo-cortical	
<b>Str:</b> Estriado	
<b>TEM:</b> Microscopía electrónica de transmisión	
<b>TC:</b> Tálamo-cortical	
<b>TCA:</b> Axón tálamo-cortical	
<b>Th:</b> Tálamo	

## BIBLIOGRAFÍA

---

Adams P, Cox K. 2002. A new interpretation of thalamocortical circuitry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:1767-1779.

Agmon A, Connors BW. 1992. Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 12:319-329.

Agmon A, Yang LT, Jones EG, O'Dowd DK. 1995. Topological precision in the thalamic projection to neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 15:549-561.

Ahissar E, Sosnik R, Bagdasarian K, Haidarliu S. 2001. Temporal frequency of whisker movement. II. Laminar organization of cortical representations. *J Neurophysiol.* 86:354-367.

Ahissar E, Sosnik R, Haidarliu S. 2000. Transformation from temporal to rate coding in a somatosensory thalamocortical pathway. *Nature.* 406:302-306.

Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ. 2000. Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci.* 3:445-451.

Ahmed B, Anderson JC, Douglas RJ, Martin KA, Nelson JC. 1994. Polyneural innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol.* 341:39-49.

Akert K, Streit P, Sandri C, Livingston R, Moor H. 1972. Synapses as indicators of elevated and depressed activity. An electron microscopic analysis. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr.* 111:227-236.

Alabi AA, Tsien RW. 2012. Synaptic vesicles pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a013680.

Anderson JC, da Costa NM, Martin KA. 2009. The W cell pathway to cat primary visual cortex. *J Comp Neurol.* 516:20-35.

Arabzadeh E, Zorzin E, Diamond ME. 2005. Neuronal encoding of texture in the whisker sensory pathway. *PLoS Biol.* 3:e17.

Araya R, Eiselthal KB, Yuste R. 2006. Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:18799-18804.

Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci.* 1:131-143.

Audette NJ, Urban-Ciecko J, Matsushita M, Barth AL. 2017. POm thalamocortical input drives layer-specific microcircuits in somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 10:1-17.

Avendaño C, Stepniewska I, Rausell E, Reinoso-Suárez F. 1990. Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience.* 39: 547-559.

Barthó P, Freund TF, Acsády L. 2002. Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci.* 16:999-1014.

- Beierlein M, Gibson JR, Connors BW. 2003. Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J Neurophysiol.* 90:2987–3000.
- Belford GR, Killackey HP. 1979. Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. *J Comp Neurol.* 183:305-321.
- Benshalom G, White EL. 1986. Quantification of thalamocortical synapses with spiny stellate neurons in layer IV of mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 253:303–314.
- Bezudnaya T, Keller A. 2008. Laterodorsal nucleus of the thalamus: A processor of somatosensory inputs. *J Comp Neurol.* 507:1979-1989.
- Bickford ME. 2016. Thalamic circuit diversity: modulation of the driver/modulator framework. *Front Neural Circuits.* 9:86.
- Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA. 2004. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci.* 24:8441-8453.
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KA, Schuhknecht GF. 2017. An ultrastructural study of the thalamic input to layer 4 of primary motor and primary somatosensory cortex in the mouse. *J Neurosci.* 37:2435-2448.
- Bosch C, Martínez A, Masachs N, Teixeira CM, Fernaud I, Ulloa F, Pérez-Martínez E, Lois C, Comella JX, DeFelipe J, Merchán-Pérez A, Soriano E. 2015. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front Neuroanat.* 9:60.
- Bosman LW, Houweling AR, Owens CB, Tanke N, Shevchouk OT, Rahmati N, Teunissen WH, Ju C, Gong W, Koekkoeck SK, De Zeeuw CI. 2011. Anatomical pathways involved in generating and sensing rhythmic whisker movements. *Front Integr Neurosci.* 5:53.
- Bourne JN, Chirillo MA, Harris KM. 2013. Presynaptic ultrastructural plasticity along CA3→CA1 axons during long-term potentiation in mature hippocampus. *J Comp Neurol.* 521:3898-3912.
- Bosch C, Martínez A, Masachs N, Teixeira CM, Fernaud I, Ulloa F, Pérez-Martínez E, Lois C, Comella JX, DeFelipe J, Merchán-Pérez A, Soriano E. 2015. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front Neuroanat.* 9:60.
- Brecht M, Roth A, Sakmann B. 2003. Dynamic receptive fields of reconstructed pyramidal cells in layers 3 and 2 of rat somatosensory barrel cortex. *J Physiol.* 553:243-265.
- Brecht M, Sakmann B. 2002. Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. *J Physiol.* 543:49–70.
- Bresler T, Shapira M, Boeckers T, Dresbach T, Futter M, Garner CC, Rosenblum K, Gundelfinger ED, Ziv NE. 2004. Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J Neurosci.* 24:1507-1520.
- Bruno RM, Sakmann B. 2006. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science.* 312:1622–1627.

- Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K. 2006. Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol.* 4:e382.
- Castejon C, Barros-Zulaica N, Nuñez A. 2016. Control of Somatosensory Cortical Processing by Thalamic Posterior Medial Nucleus: A New Role of Thalamus in Cortical Function. *PLoS One.* 11:e0148169.
- Castro-Alamancos MA, Connors BW. 1997. Thalamocortical synapses. *Prog Neurobiol.* 51:581-606.
- Cebrián C, Parent A, Prensa L. 2005. Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol.* 492:349-369.
- Chamberlin NL, Du B, de Lacalle S, Saper CB. 1998. Recombinant adeno-associate virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Research.* 793:169-175.
- Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ. 1989. Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol.* 285:325-338.
- Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB. 1992. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron.* 9:929-942.
- Chomsung RD, Wei H, Day-Brown JD, Petry HM, Bickford ME. 2010. Synaptic organization of connections between the temporal cortex and pulvinar nucleus of the tree shrew. *Cereb Cortex.* 20:997-1011.
- Chung S, Li X, Nelson SB. 2002. Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. *Neuron.* 34:437-446.
- Cipolloni PB, Hersch SM, White EL. 1985. The use of lectin transport in the mouse central nervous system as an anterograde axonal marker for electron microscopy. *Neurosci Lett.* 58:43-47.
- Clascá F, Avendaño C, Román-Guindo A, Llamas A, Reinoso-Suárez F. Innervation from the claustrum of the frontal association and motor areas: axonal transport studies in the cat. *J Comp Neurol.* 326:402-422.
- Clascá F, Porrero C, Galazo MJ, Rubio-Garrido P, Evangelio M. 2016. Anatomy and development of multispecific thalamocortical axons: implications for cortical dynamic and evolution. In: Rockland KS, *Axons And Brain Architecture.* Academic Press.
- Colonnier M. 1964. Experimental degeneration in the cerebral cortex. *J Anat.* 98:47-53.
- Colonnier M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res.* 9:268-287.
- Constantinople CM, Bruno RM. 2013. Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science.* 340:1591-1594.
- Couteaux R, Pécot-Dechavassine M. 1970. Synaptic vesicles and pouches at the level of “active zones” of the neuromuscular junction. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 271:2346-2349.
- Crandall SR, Cruikshank SJ, Connors BW. 2015. A corticothalamic switch: controlling the thalamus with dynamic synapses. *Neuron.* 86:768-782.



- Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW. 2007. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci.* 10:462-468.
- Cunningham ET Jr, Levay S. 1986. Laminar and synaptic organization of the projection from the thalamic nucleus centralis to primary visual cortex in the cat. *J Comp Neurol.* 254:66-77.
- Da Costa NM, Martin KA. 2009. The proportion of synapses formed by the axons of the lateral geniculate nucleus in layer 4 of area 17 of the cat. *J Comp Neurol.* 516:264-276.
- Da Costa NM, Martin KA. 2011. How thalamus connects to spiny stellate cells in the cat's visual cortex. *J Neurosci.* 31:2925-2937.
- Da Costa NM, Martin KA. 2013. Sparse reconstruction of brain circuits: or, how to survive without a microscopic connectome. *Neuroimage.* 80:27-36.
- Davis TL, Sterling P. 1979. Microcircuitry of cat visual cortex: classification of neurons in layer IV of area 17, and identification of the patterns of lateral geniculate input. *J Comp Neurol.* 188:599-628.
- DeFelipe J. 2015. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat.* 9:14.
- De Kock CP, Bruno RM, Spors H, Sakmann B. 2007. Layer- and cell-type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. *J Physiol.* 581:139-154.
- Denk W, Horstmann H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *Plos Biol.* 2:e329.
- Deschênes M, Timofeeva E, Lavallée P, Dufresne C. 2005. The vibrissal system as a model of thalamic operations. *Prog Brain Res.* 149:31-40.
- Deschênes M, Veinante P, Zhang ZW. 1998. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev.* 28:286-308.
- Diamond ME. 1995. Somatosensory Thalamus of the Rat. In: *The Barrel Cortex of Rodents. Cerebral Cortex.* Volume 11. Pp. 189-219.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF. 1992. Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. *J Comp Neurol.* 318:462-476.
- Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E. 2008. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci.* 9:601-612.
- Douglas RJ, Koch C, Mahowald M, Martin KA, Suarez HH. 1995. Recurrent excitation in neocortical circuits. *Science.* 269:981-985.
- Douglas RJ, Martin KA. 2007. The butterfly and the loom. *Brain Res Rev.* 55:314-328.
- Dufour A, Rollenhagen A, Sätzler K, Lübke JHR. 2016. Development of synaptic boutons in layer 4 of the barrel field of the rat somatosensory cortex: a quantitative analysis. *Cereb Cortex.* 26:838-854.

- Egger V, Nevian T, Bruno RM 2008. Subcolumnar dendritic and axonal organization of spiny stellate and star pyramid neurons within a barrel in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex*. 18:876-889.
- Erisir A, Dreusicke M. 2005. Quantitative morphology and postsynaptic targets of thalamocortical axons in critical period and adult ferret visual cortex. *J Comp Neurol*. 485:11-31.
- Erzurumlu RS, Killackey HP. 1980. Diencephalic projections of the subnucleus interpolaris of the brainstem trigeminal complex in the rat. *Neuroscience*. 5:1891-1901.
- Erzurumlu RS, Murakami Y, Rijli FM. Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nat Rev Neurosci*. 11:252-263.
- Familtsev D, Quiggins R, Masterson SP, Dang W, Slusarczyk AC, Petry HM, Bickford ME. 2016. Ultrastructure of geniculocortical synaptic connections in the tree shrew striate cortex. *J Comp Neurol*. 524:1292-1306.
- Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CC, Poulet JF, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C. 2013. Barrel cortex function. *Prog Neurobiol*. 103:3-27.
- Feldmeyer D, Egger V, Lübke J, Sakmann B. 1999. Reliable synaptic connections between pairs of excitatory layer 4 neurones within a single 'barrel' of developing rat somatosensory cortex. *J Physiol*. 521:169-190.
- Ferster D, Chung S, Wheat H. 1996. Orientation selectivity of thalamic input to simple cells of cat visual cortex. *Nature*. 380:249-252.
- Fiala JC. 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc*. 218:52-61.
- Frangoul L, Porrero C, Garcia-Amado M, Maimone B, Maniglier M, Clascá F, Jabaudon D. 2014. Specific activation of the paralemnisal pathway during nociception. *Eur J Neurosci*. 39:1455-1464.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2008. The mouse brain stereotaxic coordinates. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier: Academic Press. New York.
- Friedberg MH, Lee SM, Ebner FF. 1999. Modulation of receptive field properties of thalamic somatosensory neurons by the depth of anesthesia. *J Neurophysiol*. 81:2243-2252.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE. 2000 Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron*. 27:57-69.
- Fox K. 2008. Barrel Cortex. Cambridge. Cambridge University Press.
- Furuta T, Kaneko T, Deschênes M. 2009. Septal neurons in barrel cortex derive their receptive field input from the lemniscal pathway. *J Neurosci*. 29:4089-4095.
- Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. 2001. In vivo transduction of central neurons using recombinant sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J Histochem Cytochem*. 49:1497-1507.
- Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M. 2005. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*. 48:315-327.

- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geneisman Y. 2004. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neuroscience*. 125:615-623.
- Garey LJ, Powell TP. 1971. An experimental study of the termination of the lateral geniculocortical pathway in the cat and monkey. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 179:41-63.
- Geinisman Y. 1993. Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity. *Hippocampus*. 3:417-433.
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F. 1991. Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res*. 566:77-88.
- Gil Z, Amitai Y. 1996. Properties of convergent thalamocortical and intracortical synaptic potentials in single neurons of neocortex. *J Neurosci*. 16:6567-6578.
- Gil Z, Connors BW, Amitai Y. 1999. Efficacy of thalamocortical and intracortical synaptic connections: quanta, innervation, and reliability. *Neuron*. 23:385-397.
- Gray EG. 1959a. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature*. 183:1592-1593.
- Gray EG. 1959b. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat*. 93:420-433.
- Gray EG. 1963. Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J Anat*. 97:101-106.
- Groenewegen HJ, Witter MP. 2004. Thalamus. In *The Rat Nervous System*, ed G. Paxinos. 3rd Edn. Sidney: Academic Press. 407-453.
- Guillery RW, Sherman SM. 2011. Branched thalamic afferents: what are the messages that they relay to the cortex? *Brain Res Rev*. 66:205-219.
- Guy J, Sachkova A, Möck M, Witte M, Wagener RJ, Staiger JF. 2016. Intracortical network effects preserve thalamocortical input efficacy in a cortex without layers. *Cereb Cortex*. 12.
- Hagihara K, Tsumoto T, Sato H, Hata Y. 1988. Actions of excitatory amino acid antagonists on geniculo-cortical transmission in the cat's visual cortex. *Exp Brain Res*. 69:407-416.
- Haidarliu S, Ahissar E. 2001. Size gradients of barreloids in the rat thalamus. *J Comp Neurol*. 429:372-387.
- Haidarliu S, Yu C, Robin N, Ahissar E. 2008. Lemniscal and extralemniscal compartments in the VPM of the rat. *Front Neuroanat*. 2:4.
- Harata N, Pyle JL, Aravanis AM, Mozhayeva M, Kavalali ET, Tsien RW. 2001. Limited numbers of recycling vesicles in small CNS nerve terminals: implications for neural signaling and vesicular cycling. *Trends Neurosci*. 24:637-643.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*. 12:2685-2705.

- Harris KM, Sultan P. 1995. Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology*. 34:1387-1395.
- Hayashi H. 1980. Distributions of vibrissae afferent fiber collaterals in the trigeminal nuclei as revealed by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Brain Res*. 183:442-446.
- Helmstaedter M. 2013. Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods*. 10:501-507.
- Herkenham M. 1978. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol*. 177:568-610.
- Herkenham M. 1979. The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat". *J Comp Neurol*. 183:487-517.
- Herkenham M. 1980. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science*. 207:532-535.
- Herkenham M. 1986. New perspectives on the organization and evolution of nonspecific thalamocortical projections. En *Cerebral Cortex Vol 5*, Jones EG, Peters A (eds.) New York, Plenum. 403-445.
- Hersch SM, White EL. 1981. Thalamocortical synapses involving identified neurons in mouse primary somatosensory cortex: a terminal degeneration and golgi/EM study. *J Comp Neurol*. 195:253-263.
- Hicks TP, Kaneko T, Metherate R, Oka JI, Stark CA. 1991. Amino acids as transmitters of synaptic excitation in neocortical sensory processes. *Can J Physiol Pharmacol*. 69:1099-1114.
- Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, KnottGW, Svoboda K. 2005. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*. 45:279–291.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*. 10:647-658.
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M. 2017. Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *J Comp Neurol*. doi: 10.1002/cne.24196.
- Hur EE, Zaborsky L. 2005. Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 483:351-373.
- Jones EG. 1998a. A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections. *Adv Neurol*. 77:49-71.
- Jones EG. 1998b. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience*. 85:331-345.
- Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 24:595-601.
- Jones EG. 2002. Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 357:1659-1673.

- Jones EG. 2007. *The Thalamus*. Second ed. Cambridge University Press, New York.
- Jones EG, Powell TPS. 1970. An electron microscopic study of the laminar pattern and mode of termination of afferent fibre pathways in the somatic sensory cortex of the cat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 257:45–62.
- Jones LM, Depireux DA, Simons DJ, Keller A. 2004. Robust temporal coding in the trigeminal system. *Science*. 304:1986-1989.
- Kaneko T, Mizuno N. 1988. Immunohistochemical study of glutaminase-containing neurons in the cerebral cortex and thalamus of the rat. *J Comp Neurol*. 267:590-602.
- Keller A, White EL, Cipolloni PB. 1985. The identification of thalamocortical axon terminals in barrels of mouse Sml cortex using immunohistochemistry of anterogradely transported lectin (Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin). *Brain Res*. 343:159-165.
- Keller A, White EL. 1987. Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse Sml cortex. *J Comp Neurol*. 262:1-12.
- Kharazia VN, Weinberg RJ. 1994. Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *J Neurosci*. 14:6021-6032.
- Killackey HP. 1973. Anatomical evidence for cortical subdivisions based on vertically discrete thalamic projections from the ventral posterior nucleus to cortical barrels in the rat. *Brain Res*. 51:326-331.
- Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. 2008. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci*. 28:2959-2964.
- Koester HJ, Johnston D. 2005. Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses. *Science*. 308:863-866.
- Kölliker A. 1896. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, 6th ed, VolIII. Nervensystem des Menschen und der Thiere. Leipzig. Engelmann.
- Konur S, Yuste R. 2004. Imaging the motility of dendritic protrusions and axon terminals: roles in axon sampling and synaptic competition. *Mol Cell Neurosci*. 27:427–440.
- Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP. 1988. Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res*. 463:346-351.
- Korogod N, Petersen CC, Knott GW. 2015. Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *eLife*. 4.
- Krubitzer L, Campi KL, Cooke DF. 2011. All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization. *Brain Behav Evol*. 78:51-93.
- Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. 2007. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci*. 27:1139-1150.
- Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, Mohamed AA, Karube F, Lübke J, Kawaguchi Y. 2015. Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *Elife*. 4. doi: 10.7554/eLife.07919.

- Kuhlman SJ, O'Connor DH, Fox K, Svoboda K. 2014. Structural plasticity within the barrel cortex during initial phases of whisker-dependent learning. *J Neurosci.* 34:6078-6083.
- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. 2009. Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron-tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex.*19:2065-2077.
- Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. 2015. Ventral medial nucleus neurons send thalamocortical afferents more widely and more preferentially to layer 1 than neurons of the ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in the rat. *Cereb Cortex.* 25:221-235.
- Kuroda M, Yokofujita J, Murakami K. 1998. An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Prog Neurobiol.* 54:417-458.
- Land PW, Buffer SA Jr, Yaskosky JD. 1995. Barreloids in adult rat thalamus: three-dimensional architecture and relationship to somatosensory cortical barrels. *J Comp Neurol.* 355:573-588.
- Latawiec D, Martin KAC, Meskenaite V. 2000. Termination of the geniculocortical projection in the striate cortex of macaque monkey: a quantitative immunoelectron microscopic study. *J Comp Neurol.* 419:306-319.
- Le Gros Clark WE. 1932. The structure and connections of the thalamus. *Brain.* 55:406-470.
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC. 2009. The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron.* 61:301-316.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature.* 404:876-881.
- Lev DL, Weinfeld E, White EL. 2002. Synaptic patterns of thalamocortical afferents in mouse barrels at postnatal day 11. *J Comp Neurol.* 442:63-77
- Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S. Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell.* 76:427-437.
- Llinás RR, Steriade M. 2006. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol.* 95:3297-3308
- López-Bendito G, Mólnar Z. 2003. Thalamocortical development: How are we going to get there? *Nature Rev Neurosci.* 4:276-289.
- Lorente de Nó R. 1922. La corteza cerebral del ratón (primera contribución – la corteza “acústica”). *Trab Lab Inv Biol Univ Mad* 20:41-78. Reimpresión traducida al inglés en *Somatosens Mot Res.* 9:3-36.
- Lu SM, Lin RC. 1993. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res.* 10:1-16.
- Lübke J, Egger V, Sakmann B, Feldmeyer D. 2000. Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J Neurosci.* 20:5300-5311.

- Macchi G. 1983. Old and new anatomo-functional criteria in the subdivision of the thalamic nuclei. En *Somatosensory Integration in the Thalamus*. Macchi G, Rustoni A, Spreafico R (Eds.). Amsterdam. Elsevier Science Publishers. 3-15.
- Maglio LE, Noriega-Prieto JA, Maraver MJ, Fernández de Sevilla D. 2017. Endocannabinoid-dependent long-term potentiation of synaptic transmission at rat barrel cortex. *Cereb Cortex*. 1:1-14.
- Majewska A, Sur M. 2003. Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: changes during the critical period and effects of visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:16024-16029.
- Marion R, Li K, Purushothaman G, Jiang Y, Casagrande VA. 2013. Morphological and neurochemical comparisons between pulvinar and V1 projections to V2. *J Comp Neurol*. 521:813-832.
- Markram H. 2006. The blue brain project. *Nat Rev Neurosci*. 7:153-160.
- Marrone DF, LeBoutillier JC, Petit TL. 2005. Ultrastructural correlates of vesicular docking in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*. 378:92-97.
- Martin-Cortecero J, Nuñez A. 2014. Tactile response adaptation to whisker stimulation in the lemniscal somatosensory pathway of rats. *Brain Res*. 1591:27-37.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*. 4:1086-1092.
- Medalla M, Luebke JI. 2015. Diversity of glutamatergic synaptic strength in lateral prefrontal versus primary visual cortices in the rhesus monkey. *J Neurosci*. 35:112-127.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez J-R, Alonso-Nanclares L, Schertel A, Defelipe J. 2009. Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat*. 3:18.
- Meyer HS, Wimmer VC, Oberlaender M, de Kock CP, Sakmann B, Helmstaedter M. 2010. Number and laminar distribution of neurons in a thalamocortical projection column of rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex*. 20:2277-2286.
- Micheva KD, Smith SJ. 2007. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron*. 55:25-36.
- Mironov SL. 2006. Spontaneous and evoked neuronal activities regulate movements of single neuronal mitochondria. *Synapse*. 59:403-411.
- Mironov SL, Symonchuk N. 2006. ER vesicles and mitochondria move and communicate at synapses. *J Cell Sci*. 119:4926-4934.
- Mólnar Z, Adams R, Blakemore C. 1998. Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci*. 18:5723-5745.
- Montes J, Peña JM, DeFelipe J, Herreras O, Merchán-Pérez A. 2015. The Influence of Synaptic Size on AMPA Receptor Activation: A Monte Carlo Model. *PLoS One*. 10:e0130924.

- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez JR, DeFelipe J, Rodríguez A, Merchán-Pérez A. 2011. Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat.* 5:18.
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez J-R, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. 2013. Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front Neuroanat.* 7:20.
- Mountcastle VB. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol.* 20:408-434.
- Mumford D. 1995. Thalamus, in : M.A. Arbib (Eds.), *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. MIT Press. Cambridge, MA. 153-157.
- Murray KD, Choudary PV, Jones EG. 2007. Nucleus- and cell-specific gene expression in monkey thalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:1989–1994.
- Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T. 2015. Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: a single-neuron tracing study with viral vectors. *Eur J Neurosci.* 41:1294-1310.
- Nava N, Chen F, Wegener G, Popoli M, Nyengaard JR. 2014. A new efficient method for synaptic vesicle quantification reveals differences between medial prefrontal cortex perforated and nonperforated synapses. *J Comp Neurol.* 522:284-297.
- Negyessy L, Goldman-Rakic PS. 2005. Morphometric characterization of synapses in the primate prefrontal cortex formed by afferents from the mediodorsal thalamic nucleus. *Exp Brain Res.* 164:148-154.
- Nicholson DA, Trana R, Katz Y, Kath WL; Spruston N, Geinisman Y. 2006. Distance-dependent differences in synapse number and AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron.* 50:431-442.
- Nieto-Sampietro M, Hoff SF, Cotman CW. 1982. Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79:5718-5722.
- Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L. 2010. Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. *J Neurosci.* 30:14420-14429.
- Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. 2011. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci.* 31:14204-14217.
- Oberlaender M, de Kock CP, Bruno RM, Ramirez A, Meyer HS, Dercksen VJ, Helmstaedter M, Sakmann B. 2012. Cell typespecific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissa cortex. *Cereb Cortex.* 22:2375–2391.
- Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. 2012. A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: a single neuron tracing study with viral vectors. *Cereb Cortex.* 22:2840-2857.
- Okabe S. 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol Cell Neurosci.* 34:503-518.



- Okabe S, Miwa A, Okado H. 2001. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci*. 21:6105-6114.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 32:421-431.
- Perkins GA, Tjong J, Brown JM, Poquiz PH, Scott RT, Kolson DR, Ellisman MH, Spirou GA. 2010. The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci*. 30:1015-1026.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1969. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The synapses upon dendritic spines. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 100:487-506.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*. 127:321-355.
- Peters A, Palay SL, Webster H. 1991. *The fine structure of the Nervous System*. 3<sup>rd</sup> edition. New York. Oxford University Press.
- Peters A, Palay SL. 1996. The morphology of synapses. *J Neurocytol*. 25:687-700.
- Peters A, Payne BR. 1993. Numerical relationships between geniculocortical afferents and pyramidal cell modules in cat primary visual cortex. *Cereb Cortex*. 3:69-78.
- Peters A, White EL, Fairén A. 1977. Synapses between identified neuronal elements. An electron microscopic demonstration of degenerating axon terminals synapsing with Golgi impregnated neurons. *Neurosci Lett*. 6:171-175.
- Petersen CC. 2007. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*. 56:339-55.
- Petersen CC, Hahn TT, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B. 2003. Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:13638-13643.
- Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. 2009. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature*. 457:1142-1145.
- Pierret T, Lavallée P, Deschênes M. 2000. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J Neurosci*. 20:7455-7462.
- Pinault D. 1996. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods*. 65:113-136.
- Pinto MJ, Almeida RD. 2016. Puzzling out presynaptic differentiation. *J Neurochem*. 139:921-942.
- Porrero C. 2016. *Arquitecturas axónicas y organización de las neuronas de proyección multiespecífica del tálamo: estudio en el núcleo posterior de ratón*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Quetglas JJ, Smerdou C, Furuta T, Clascá F. 2016. A simple and efficient in vivo non-viral RNA transfection method for labeling the whole axonal tree of individual adult long-range projection neurons. *Front Neuroanat*. 10:27.

- Porter JT, Johnson CK, Agmon A. 2001. Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 21:2699-2710.
- Pozzan T, Magalhaes P, Rizzuto R. 2000. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium.* 28:279-283.
- Prensa L, Parent A. 2001. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci.* 21:7247-7260.
- Puelles L, Rubenstein JL. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26:469-476.
- Qi G, Feldmeyer D. 2016. Dendritic Target Region-Specific Formation of Synapses Between Excitatory Layer 4 Neurons and Layer 6 Pyramidal Cells. *Cereb Cortex.* 26:1569-1579.
- Ramón y Cajal S. 1888. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Pat.* 1:1-10.
- Rausell E, Avendaño C. 1985. Thalamocortical neurons projecting to superficial and to deep layers in parietal, frontal and prefrontal regions in the cat. *Brain Res.* 347:159-165.
- Rausell E, Jones EG. 1995. Extent of intracortical arborization of thalamocortical axons as a determinant of representational plasticity in monkey somatic sensory cortex. *J Neurosci.* 15:4270-4288.
- Reyes-Puerta V, Sun JJ, Kim S, Kilb W, Luhmann HJ. 2015. Laminar and columnar structure of sensory-evoked multineuronal spike sequences in adult rat barrel cortex in vivo. *Cereb Cortex.* 25:2001-2021.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17:208-212.
- Rizzoli SO, Betz WJ. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci.* 6:57-69.
- Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol.* 529:37-47.
- Rollenhagen A, Klook K, Sätzler K, Qi G, Anstötz M, Feldmeyer D, Lübke JHR. 2015. Structural determinants underlying the high efficacy of synaptic transmission and plasticity at synaptic boutons in layer 4 of the adult rat barrel cortex. *Brain Struct Funct.* 220:3185–3209.
- Rose JE, Woolsey CN. 1949. Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *EEG Clin Neurophysiol.* 1:391-404.
- Rosenmund C, Stevens CF. 1996. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron.* 16:1197-1207.
- Rovó Z, Ulbert I, Acsády L. 2012. Drivers of the primate thalamus. *J Neurosci.* 32:17894-17908.
- Rowland KC, Irby NK, Spirou GA. 2000. Specialized synapse-associated structures within the calyx of Held. *J Neurosci.* 20:9135-9144.

Rubio-Garrido P, Pérez-de-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clascá F. 2009. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex*. 19:2380-2395.

Salt TE, Meier CL, Seno N, Krucker T, Herrling PL. 1995. Thalamocortical and corticocortical excitatory postsynaptic potentials by excitatory amino acid receptors in the cat motor cortex in vivo. *Neuroscience*. 64:433-442.

Sätzler K, Söhl LF, Bollmann JH, Borst JG, Frotscher M, Sakmann B, Lübke JHR. 2002. Three-dimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci*. 22:10567-10579.

Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:4107-4112.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth*. 9:676-682.

Schoonover CE, Tapia JC, Schilling VC, Wimmer V, Blazeski R, Zhang W, Mason CA, Bruno RM. 2014. Comparative strength and dendritic organization of thalamocortical and corticocortical synapses onto excitatory layer 4 neurons. *J Neurosci*. 34:6746-6758.

Shanks MF, Powell TP. 1981. An electron microscopic study of the termination of thalamocortical fibres in areas 3b, 1 and 2 of the somatic sensory cortex in the monkey. *Brain Res*. 218:35-47.

Shepherd GM, Harris KM. 1998. Three-dimensional structure and composition of CA3-->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *J Neurosci*. 18:8300-8310.

Sherman SM. 2012. Thalamocortical interactions. *Curr Opin Neurobiol*. 22:575-579.

Sherman SM, Guillery RW. 2006. Exploring the thalamus and its role in cortical function. Cambridge (UK): MIT Press.

Sherman SM, Guillery RW. 2011. Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *J Neurophysiol*. 106:1068-1077.

Sherrington CS. 1897. In *A Textbook of Physiology* 7th ed Pt 3. Foster, M. & Sherrington, C. S. Macmillan, London. 915-1000.

Shigematsu N, Ueta Y, Mohamed AA, Hatada S, Fukuda T, Kubota Y, Kawaguchi Y. 2016. Selective thalamic innervation of rat frontal cortical neurons. *Cereb Cortex*. 26:2689-2704.

Shu SY, Ju G, Fan LZ. 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*. 85:169-171.

Simons DJ, Carvell GE. 1989. Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J Neurophysiol*. 61:311-330.

Smith HL, Bourne JN, Cao G, Chirillo MA, Ostroff LE, Watson DJ, Harris KM. 2016. Mitochondrial support of persistent presynaptic vesicle mobilization with age-dependent synaptic growth after LTP. *Elife*. 5. pii:e15275.

- Smith PH, Uhlich DJ, Manning KA, Banks MI. 2012. Thalamocortical projections to rat auditory cortex from the ventral and dorsal divisions of the medial geniculate nucleus. *J Comp Neurol.* 520:34-51.
- Spacek J, Harris KM. 1998. Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 393:58-68.
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF. 1996. Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 8:2273-2285.
- Staiger JF, Zuschratter W, Luhmann HJ, Schubert D. 2009. Local circuits targeting parvalbumin-containing interneurons in layer IV of rat barrel cortex. *Brain Struct Funct.* 214:1-13.
- Stratford KJ, Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Bannister NJ, Jack JJ. 1996. Excitatory synaptic inputs to spiny stellate cells in cat visual cortex. *Nature.* 382:258-261.
- Südhof TC. 2012. The presynaptic active zone. *Neuron.* 75:11-25.
- Sultan F, König T, Möck M, Their P. 2002. Quantitative organization of neurotransmitters in the deep cerebellar nuclei of the Lurcher mutant. *J Comp Neurol.* 452:311-323.
- Sun QQ, Huguenard JR, Prince DA. 2006. Barrel cortex microcircuits: thalamocortical feedforward inhibition in spiny stellate cells is mediated by a small number of fast-spiking interneurons. *J Neurosci.* 26:1219-1230.
- Swadlow HA. 1995. Influence of VPM afferents on putative inhibitory interneurons in S1 of the awake rabbit: evidence from cross-correlation, microstimulation, and latencies to peripheral sensory stimulation. *J Neurophysiol.* 73:1584-1599.
- Swadlow HA. 2003. Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb Cortex.* 13:25-32.
- Swadlow HA, Gusev AG, Bezdudnaya T. 2002. Activation of a cortical column by a thalamocortical impulse. *J Neurosci.* 22:7766-7773.
- Tamura H, Hicks TP, Hata Y, Tsumoto T, Yamatodani A. 1990. Release of glutamate and aspartate from the visual cortex of the cat following activation of afferent pathways. *Exp Brain Res.* 80:447-455.
- Theyel B, Llano D, Sherman SM. 2010. The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nature Neurosci.* 13:84-88.
- Torrealba F, Carrasco MA. 2004. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Brain Res Rev.* 47:5-17.
- Trageser JC, Keller A. 2004. Reducing the uncertainty: gating of peripheral inputs by zona incerta. *J Neurosci.* 24:8911-8915.
- Triller A, Korn H. 1985. Activity-dependent deformations of presynaptic grids at central synapses. *J Neurocytol.* 14:177-192.
- Tsumoto T, Masui H, Sato H. 1986. Excitatory amino acid transmitters in neuronal circuits of the cat visual cortex. *J Neurophysiol.* 55:469-483.

- Umeda T, Ebihara T, Okabe S. 2005. Simultaneous observation of stably associated presynaptic varicosities and postsynaptic spines: morphological alterations of CA3-CA1 synapses in hippocampal slice cultures. *Mol Cell Neurosci*. 28:264–274.
- Veinante P, Deschênes M. 1999. Single- and multi-whisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J Neurosci*. 19:5085-5095.
- Veinante P, Deschênes M. 2003. Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J Comp Neurol*. 464:98-103.
- Veinante P, Jacquin MF, Deschênes M. 2000. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol*. 420:233-243.
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*. 47:365-378.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:18156-18161.
- Vitali I, Jabaudon D. 2014. Synaptic biology of barrel cortex circuit assembly. *Semin Cell Dev Biol*. 35:156-164.
- Wagener RJ, Witte M, Guy J, Mingo-Moreno N, Kügler S, Staiger JF. 2016. Thalamocortical connections drive intracortical activation of functional columns in the mislaminated reeler somatosensory cortex. *Cereb Cortex*. 26:820-837.
- Walker AE. 1937. The thalamus in relation to the cerebral cortex. *J Nerv Ment Dis*. 85:249-261.
- Waller WH. 1934. Topographical relations of cortical lesions to thalamic nuclei in the albino rat. *J Comp Neurol*. 60:237-269.
- Wang HP, Spencer D, Fellous JM, Sejnowski TJ. 2010. Synchrony of thalamocortical inputs maximizes cortical reliability. *Science*. 328:106-109.
- Wehr M, Zador AM. 2003. Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*. 426:442-446.
- Welker C, Woolsey TA. 1974. Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *J Comp Neurol*. 158:437-453.
- White EL. 1978. Identified neurons in mouse SmI cortex which are postsynaptic to thalamocortical axon terminals: A combined Golgi/electron microscopic and degeneration study. *J Comp Neurol*. 181:627–662.
- White EL. 1989. *Cortical circuits synaptic organization of the cerebral cortex; structure, function and theory*. 1st ed. Boston. Birkhauser.
- White EL, Benshalom G, Hersch SM. 1984. Thalamocortical and other synapses involving nonspiny multipolar cells of mouse SmI cortex. *J Comp Neurol*. 229:311-320.
- White EL, Hersch SM. 1982. A quantitative study of thalamocortical and other synapses involving the apical dendrites of corticothalamic projection cells in mouse SmI cortex. *J Neurocytol*. 11:137-157.

- White EL, Keller A. 1987. Intrinsic circuitry involving the local axonal collaterals of corticothalamic projection cells in mouse SmI cortex. *J Comp Neurol* 262:13–26.
- White EL, Rock MP. 1979. Distribution of thalamic input to different dendrites of a spiny stellate cell in mouse sensorimotor cortex. *Neurosci Lett*. 15:115-119.
- White EL, Weinfeld E, Lev DL. 2004. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *J Comp Neurol*. 479:56-69.
- Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammer B, Koo SJ, Claßen GA, Krauss M, Haucke V, Urlaub H, Rizzoli SO. 2014. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*. 344:1023-1028.
- Williams MN, Zahm DS, Jacquin MF. 1994. Differential foci and synaptic organization of the principal and spinal trigeminal projections to the thalamus in the rat. *Eur J Neurosci*. 6:429-453.
- Woolsey TA, Van der Loos H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res*. 17:205-242.
- Yu C, Derdikman D, Haidarliu S, Ahissar E. 2006. Parallel thalamic pathways for whisking and touch signals in the rat. *PLoS Biol*. 4:e124.
- Yu C, Horev G, Rubin N, Derdikman D, Haidarliu S, Ahissar E. 2015. Coding of object location in the vibrissal thalamocortical system. *Cereb Cortex*. 25:563-577.
- Yuste R. 2011. Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron*. 71:772-81.
- Yuste R, Denk W. 1995. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*. 375:682-684.
- Yuste R, Majewska A, Holthoff K. 2000. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci*. 3:653-659.
- Zhao S, Studer D, Chai X, Graber W, Brose N, Nestel S, Young C, Rodriguez EP, Sätzler K, Frotscher M. 2012a. Structural plasticity of hippocampal mossy fiber synapses as revealed by highpressure freezing. *J Comp Neurol*. 520:2340-2351.
- Zhao S, Studer D, Graber W, Nestel S, Frotscher M. 2012b. Fine structure of hippocampal mossy fiber synapses following rapid high-pressure freezing. *Epilepsia*. 53:4-8.
- Zhu JJ, Connors BW. 1999. Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurophysiol*. 81:1171-1183.